



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERIZAÇÃO DE RECETORES DO LINFOMA CANINO PARA IMUNOTERAPIA

ANDRÉ GIL PEDRO PINTO DE ALMEIDA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares  
Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia  
Doutor Frederico Nuno Castanheira Aires da Silva

ORIENTADOR

Doutor Frederico Nuno  
Castanheira Aires da Silva

COORDINADORA

Doutora Solange Judite Roque  
Coelho Alves Gil

2018

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERIZAÇÃO DE RECETORES DO LINFOMA CANINO PARA IMUNOTERAPIA

ANDRÉ GIL PEDRO PINTO DE ALMEIDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares  
Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia  
Doutor Frederico Nuno Castanheira Aires da Silva

ORIENTADOR

Doutor Frederico Nuno  
Castanheira Aires da Silva

COORDINADORA

Doutora Solange Judite Roque  
Coelho Alves Gil

2018

LISBOA

---

## **Agradecimentos**

À minha família, pelo apoio que me deram ao longo da vida, por acreditarem em mim e quererem o meu bem.

Às entidades financiadoras deste projeto, nomeadamente o CIISA, através do Projeto CIISA 15 da Professora Doutora Solange Gil: “Clinical and immunological characterization of naturally occurring canine lymphoma”, e a Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projeto do Doutor Frederico Aires da Silva, IF/01010/201.

Ao meu orientador, o Doutor Frederico Aires da Silva, por me ter aceite como seu orientando, pela sua paciência, por partilhar a sua visão científica e estimular a minha vontade de fazer e descobrir mais.

À minha coorientadora, a Professora Doutora Solange Gil, por me ter aceite como seu orientando e me permitir trabalhar em áreas tão interessantes como a imunologia e a oncologia, pela sua simpatia constante e pela sua ajuda durante o desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Joana Dias, que também considero como orientadora, por toda a paciência que teve comigo, por todo o apoio e dedicação, por todas as coisas que me ensinou e por todas as vezes que me fez companhia escada a cima e escada a baixo.

À Doutora Sandra Aguiar e à Mestre Ana André, por todo o auxílio prestado e pelos conselhos que me deram. De ambas levo na memória o excelente profissionalismo.

Ao Professor Doutor Luís Tavares, por ter disponibilizado os meios para a realização do Projeto Linfoma, no qual o trabalho que consta na presente dissertação de mestrado esteve incluído.

Ao Professor Doutor Telmo Nunes, pelas vezes em que abdicou do seu próprio tempo livre para ajudar os alunos, pela sua boa disposição e paciência para avaliar cada obstáculo e justificar cada solução.

Ao Doutor Pedro Bule, por ter estado à disposição, por me ter amparado no trabalho de modelação, e por ter partilhado os seus conhecimentos relativos aos prótidos. Contribuiu, indubitavelmente, para o enriquecimento da presente dissertação.

À Professora Doutora Ana Duarte, pela sua companhia no laboratório e pelas histórias que contou, pelos momentos de ensino e pelo seu encorajamento nos períodos de dúvida.

A todas as pessoas que despenderam um pouquinho do seu tempo para me auxiliar no meu trabalho: Sandra Carvalho, Clara Cartaxeiro, Carla Carneiro, Gonçalo Frouco, entre outras pessoas com quem partilhei o local de trabalho.

Aos meus amigos e colegas da turma C, por todo o apoio que me deram ao longo do curso, pela vossa companhia, estou-vos imensamente grato por todas as experiências que partilhámos. Deixo um obrigado especial para a Catarina Sofia Guimarães da Cunha, o João Miguel Próspero dos Santos Lory Costa, o Luís Rafael Guerreiro Capela, a Mafalda Belo Ribeiro, a Mariana Gomes Simões Pestana Mateus, o Paulo Filipe Valverde das Neves, a Rita Maria Santos Cameira, a Sofia Rodrigues Pescada Mendes Farinha, e, por último, mas não menos importante, o Telmo Filipe Ferreira Casimiro. *Iodo, Carbono, Hidrog nio, Lítio, Európio, Berílio, Európio, Carbono, Hidrog nio, Alumínio, Lantânio.*

## Resumo

### Caracterização de Recetores do Linfoma Canino para Imunoterapia

O linfoma canino é a terceira neoplasia mais prevalente no cão, sendo a neoplasia hematopoiética mais frequente nesta espécie. Apesar da otimização dos protocolos de quimioterapia, 50% dos animais não passa do primeiro ano de sobrevida e 90% não chega aos dois anos.

O objetivo deste estudo foi caracterizar a expressão de recetores de membrana no linfoma canino com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de imunoterapias, e os recetores estudados foram o CD19, o CD20, o CD21, o CD22, o CD74 e o CD80. Para este fim recorreu-se a uma linha celular de linfoma canino de células B (CLBL-1), e a amostras de linfonodos de 22 animais diagnosticados com linfoma no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa e de 8 animais saudáveis de um grupo controlo. A partir dessas amostras fez-se quantificação relativa da expressão génica dos recetores por qRT-PCR, avaliou-se a expressão proteica de CD20 por Western Blot (WB) e sequenciou-se o CD20 pelo método de Sanger.

Os resultados obtidos pela técnica de qRT-PCR permitiram observar, em linfoma B, uma sobreexpressão génica significativa do CD19 e CD20, de 10,9 e 8,2 *folds*, respetivamente, e uma subexpressão génica significativa do CD21, do CD74 e do CD80, de respetivamente 0,05, 0,5 e 0,8 *folds*. Por sua vez, a quantificação de proteína do CD20 por WB corroborou a sua sobreexpressão em linfoma B, tendo uma correlação de 0,53 com a expressão de mRNA. A sequenciação do CD20 demonstrou que o seu gene é conservado. Observou-se, por fim, que as expressões génicas de CD19, CD20, CD21 e CD22 apresentam uma forte correlação entre si no grupo controlo, sendo esta mais fraca nos animais com linfoma B.

Conclui-se que com esta dissertação foi possível caracterizar a expressão de vários recetores e contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para o linfoma canino ao validar-se o CD20 e apontando-se o CD19, o CD22 e o CD74 como potenciais alvos de imunoterapia.

**Palavras-chave:** Linfoma canino, imunoterapia, expressão de recetores de membrana.

## **Abstract**

### **Characterization of Canine Lymphoma Receptors for Immunotherapy**

Canine lymphoma is the third most prevalent neoplasia in dogs and is the most common hematopoietic malignancy in this species. Despite the chemotherapy protocols optimization, 50% of the dogs don't survive the first year with the disease and only 10% survive 2 years.

The aim of this study was to characterize the expression of membrane receptors like CD19, CD20, CD21, CD22, CD74 and CD80, and by doing so, contribute to the development of immunotherapy for canine lymphoma. To this end, a B-cell canine lymphoma cell line (CLBL-1) was used, along with lymph node samples from 22 dogs diagnosed with canine lymphoma and a control group of 8 healthy dogs. From those samples, a relative quantification of the receptors' mRNA expression was performed by qPCR, the CD20 protein quantification was performed using Western Blot (WB), and Sanger sequencing was used to assess the CD20 exons' sequence.

The results provided by qPCR showed a significant CD19 and CD20 gene upregulation, of 10.9 and 8.2 folds respectively, and a significant downregulation of the CD21, CD74 and CD80 genes, of 0.05, 0.5 and 0.8 respectively, in canine B-cell lymphoma. The protein WB results were also consistent with a strong CD20 expression in canine B-cell lymphoma, correlating with the mRNA expression ( $Rho=-0.53$ ). All the dogs evaluated in this study had a similar CD20 gene sequence, which indicates that CD20 is a conserved gene. Finally, a strong correlation was seen between the CD19, CD20, CD21 and CD22 gene expression in the control group, but these correlations were found to be much weaker in the B-cell lymphoma group.

In conclusion, this study succeeded in the characterization of several canine lymphoma receptors and may contribute to the development of new therapies by validating the targeting of CD20 and by indicating potential immunotherapy targets like CD19, CD22 and CD74.

**Key words:** Canine lymphoma, immunotherapy, receptors' expression.

## Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Índice Geral .....	v
Lista de figuras .....	viii
Lista de tabelas.....	ix
Lista de gráficos.....	x
Lista de abreviaturas, siglas, unidades e símbolos .....	xi
Capítulo I – Relatório de estágio curricular .....	1
Capítulo II – Revisão bibliográfica.....	2
1. Linfoma não-Hodgkin humano .....	2
1.1. Utilização do cão como modelo de estudo para o linfoma humano .....	2
2. Linfoma canino.....	3
2.1. Epidemiologia .....	3
2.2. Apresentação clínica .....	4
2.3. Diagnóstico e estadiamento .....	4
2.3.1. Análises laboratoriais .....	5
2.3.2. Citologia, histologia e imunofenotipagem .....	5
2.3.3. Perfil Molecular .....	6
2.3.4. Imagiologia.....	6
2.4. Radioterapia.....	7
2.5. Quimioterapia.....	7
3. Imunoterapia .....	8
3.1. Imunoterapia ativa.....	9
3.2. Imunoterapia passiva .....	9
3.2.1. Imunoglobulinas .....	9
3.2.1.1. Anticorpos monoclonais .....	10
3.2.1.2. Efeitos terapêuticos dos anticorpos monoclonais .....	10
3.2.1.3. Anticorpos modificados .....	11
3.2.2. Transferência adotiva de linfócitos T .....	11
3.3. Alvos da imunoterapia.....	13
3.3.1. CD20.....	15



3.3.1.1. Imunoterapia direcionada ao CD20 humano.....	16
3.3.1.2. Imunoterapia direcionada ao CD20 canino.....	17
3.3.2. CD19.....	18
3.3.2.1. Imunoterapia direcionada ao CD19 humano.....	19
3.3.3. CD21.....	20
3.3.4. CD22.....	21
3.3.4.1. Imunoterapia direcionada ao CD22 humano.....	22
3.3.5. CD74.....	23
3.3.5.1. Imunoterapia direcionada ao CD74 humano.....	23
3.3.6. CD80.....	24
4. Objetivos .....	26
Capítulo III – Materiais e métodos.....	27
1. Amostra em estudo .....	27
1.1. Critérios de inclusão.....	27
1.2. Critérios de exclusão .....	27
2. Colheita das amostras.....	27
3. Processamento das amostras .....	28
3.1. Armazenamento das amostras.....	28
4. Técnicas de PCR .....	28
4.1. Extração de RNA dos linfonodos.....	28
4.2. Tratamento com DNase .....	29
4.3. Síntese de DNA complementar .....	29
4.4. PCR quantitativa em tempo real.....	30
4.4.1. Escolha e desenho dos <i>primers</i> para qRT-PCR.....	30
4.4.2. PCR quantitativa em tempo real.....	31
4.5. PCR convencional.....	33
4.5.1. Desenho dos <i>primers</i> para PCR convencional .....	33
4.5.2. Reação em cadeia da polimerase .....	33
4.5.3. Purificação de DNA.....	34
5. Western Blotting .....	34
5.1. Extração de proteína total dos linfonodos.....	35
5.2. Extração de proteína total de CLBL-1.....	35
5.3. Preparação do gel de poliacrilamida .....	35

5.4.	Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida .....	36
5.5.	Transferência por eletroforese .....	36
5.6.	Incubação com anticorpos .....	36
5.7.	Revelação por quimioluminescência .....	37
6.	Análise estatística .....	37
Capítulo IV – Resultados e discussão.....		38
1.	Caracterização da amostra .....	38
2.	Diagnóstico oncológico .....	38
3.	Caracterização do CD20 .....	38
3.1.	Avaliação da expressão de CD20 por qRT-PCR .....	38
3.2.	Avaliação da expressão de CD20 por Western Blot .....	38
3.3.	Comparação dos resultados de qRT-PCR e de WB .....	39
3.4.	Comparação dos resultados de qRT-PCR com o WB de Freire (2018) .....	41
3.5.	Sequenciação do CD20 canino .....	43
3.5.1.	Comparação entre sequências de CD20 canino .....	44
3.5.2.	Comparação entre a sequência de CD20 humano e de CD20 canino.....	45
4.	Avaliação da expressão de outros recetores por qRT-PCR.....	47
4.1.	Comparação da expressão dos vários recetores.....	48
4.2.	Valor prognóstico da expressão dos recetores.....	51
5.	Potencial dos recetores enquanto alvos de imunoterapia.....	52
6.	Limitações do estudo .....	54
7.	Perspetivas futuras .....	54
Capítulo V – Conclusão .....		55
Bibliografia.....		57
Anexo I: Abstract da comunicação oral “Histone deacetylase inhibitors – a novel therapy for canine lymphoma”. .....		68
Anexo II: Dados dos animais diagnosticados com linfoma.....		70
Anexo III: Curvas de amplificação e curvas de dissociação de qRT-PCR. ....		71
Anexo IV: Tabelas complementares ao gráfico 5. ....		75
Anexo V: Tabelas de resultados dos testes de correlação de Spearman entre recetores. ...		76

## Lista de figuras

Figura 1: Imunoterapia antineoplásica em medicina veterinária .....	8
Figura 2: Estrutura da imunoglobulina-G.....	10
Figura 3: Ilustração de uma célula saudável e de uma célula neoplásica com sobreexpressão de uma proteína transmembranar. ....	13
Figura 4: Molécula de CD20 com realce dos locais de ligação de dois mAbs .....	15
Figura 5: Estrutura da molécula de CD19 .....	18
Figura 6: Tipo de neoplasia consoante a célula que a originou .....	19
Figura 7: Composição do blinatumomab.....	20
Figura 8: Constituição da molécula de CD22 .....	21
Figura 9: Ligação e antagonismo do CD22 ao BCR.....	22
Figura 10: Coestimulação ou inibição condicional do linfócito T citotóxico mediadas pelo CD80 .....	25
Figura 11: Western Blot do extrato de proteína total de amostras do biobanco.....	39
Figura 12: Western Blot do extrato de proteína total de amostras do biobanco (Freire, 2018). .....	41
Figura 13: Gel de agarose a 2%: Bandas de CD20 canino após purificação.....	43
Figura 14: Modelo da estrutura tridimensional do CD20 canino. ....	43
Figura 15: Ligação hipotética do CD20 canino (bege) com a porção variável do rituximab (verde). ....	45
Figura 16: Pormenor do epítopo-alvo do rituximab no CD20 humano e canino.....	45
Figura 17: Principais pontes de hidrogénio e interações não-polares entre o CD20 humano (azul) e o rituximab (verde). ....	46
Figura 18: Gel de agarose a 3%: produtos da reação de qRT-PCR.....	47

## Lista de tabelas

Tabela 1: Estadiamento clínico para linfoma nos animais domésticos da OMS .....	5
Tabela 2: Preparação da mistura para a ligação do <i>primer</i> à cauda de adenosinas do mRNA. .....	29
Tabela 3: Preparação da mistura de reagentes para a retrotranscrição. ....	29
Tabela 4: Sequência dos primers desenhados para qRT-PCR. ....	31
Tabela 5: Mistura de reagentes para a reação de qRT-PCR.....	31
Tabela 6: Sequência dos <i>primers</i> desenhados para PCR convencional. ....	33
Tabela 7: Mistura de reagentes para PCR convencional. ....	33
Tabela 8: Reagentes necessários para 3 géis de poliacrilamida a 15%. ....	35
Tabela 9: Anticorpos primários utilizados.....	37
Tabela 10: Anticorpos secundários utilizados. ....	37
Tabela 11: Diferentes nucleótidos entre as sequências de CD20 canino. ....	44
Tabela 12: Diferentes resíduos de aminoácido entre as sequências de CD20 canino .....	44
Tabela 13: Comparação entre CD20 humano e CD20 canino no epítipo do rituximab.....	46
Tabela 14: Correlações estatisticamente significativas entre recetores no grupo controlo. ...	50
Tabela 15: Correlações estatisticamente significativas entre recetores nos animais com linfoma B.....	50

## Lista de gráficos

Gráfico 1: Dispersão dos resultados de qRT-PCR e de WB de linfoma B. ....	39
Gráfico 2: Dispersão dos resultados de qRT-PCR e de WB de todas as amostras. ....	40
Gráfico 3: Dispersão dos valores de WB de Freire (2018) e de qRT-PCR de linfoma B. ....	42
Gráfico 4: Dispersão dos resultados de WB de Freire (2018) e de qRT-PCR de todos os animais com linfoma. ....	42
Gráfico 5: Quantificação da expressão dos recetores nos animais com linfoma B relativamente aos animais saudáveis. ....	47
Gráfico 6: Distribuição dos valores de $\Delta Ct$ de todos os animais. ....	48
Gráfico 7: Distribuição dos valores de $\Delta Ct$ por grupo. ....	49
Gráfico 8: Dispersão dos valores de $\Delta Ct$ de CD20 e CD19 de todas as amostras. ....	49
Gráfico 9: Dispersão dos valores de $\Delta Ct$ de CD19 e CD21 em animais com linfoma B. ....	51

## Lista de abreviaturas, siglas, unidades e símbolos

%: por cento

°C: graus Celsius

Ac: Anticorpo

ADC: Anticorpo conjugado com fármaco

ADCC: Citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por células

Ag: Antígeno

APC: Célula apresentadora de antígeno

BCR: Recetor de células B

bps: Pares de bases

Ca<sup>2+</sup>: Cálcio ionizado

CAR-T: Célula T com recetor de antígeno quimérico

CD: *Cluster of Differentiation*

CDC: Citotoxicidade dependente do complemento

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

CHOP: Ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona

COP: Ciclofosfamida, vincristina e prednisona

Ct: *Threshold cycle*

CTLA-4: Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico

DLBCL: Linfoma difuso de grandes células B

DMAC: Dexametasona, melfalano, actinomicina D e citosina arabinósido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

Fc: Fragmento cristalizável

FMV-UL: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

Fv: Fragmento variável

g: grama

Hz: Hertz

IgG: Imunoglobulina-G

kDa: kilodalton

L-CHOP: L-asparaginase, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona

LNH: Linfoma não-Hodgkin

mA: miliampere

mAb: Anticorpo monoclonal

mg: miligrama

MHC: Complexo maior de histocompatibilidade

mL: mililitro

mm: milímetro

MOPP: Clorometina, vincristina, procarbazona e prednisona

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

nm: nanômetro

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORR: *Overall response rate*; Taxa de resposta geral

PBS: Tampão fosfato salino

PBS-Tween: Tampão fosfato salino com Tween a 2%

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PD-1: Proteína de morte celular programada 1

PD-L1: Ligando 1 da proteína de morte celular programada 1

PD-L2: Ligando 2 da proteína de morte celular programada 1

q.b.p.: que baste para

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

R-CHOP: Rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona

RNA: Ácido ribonucleico

RPL27: Proteína ribossomal L27

SCID: Imunodeficiência combinada grave

TAC: Tomografia axial computadorizada

TALT: Transferência adotiva de linfócitos T

TCR: Recetor de células T

Td: Temperatura de dissociação

V: Volt

WB: *Western Blot*

x g: força centrífuga relativa

$\Delta$ Ct: *delta threshold cycle*

$\Delta\Delta$ Ct: *delta delta threshold cycle*

$\mu$ g: micrograma

$\mu$ L: microlitro

$\mu$ M: micromolar

## Capítulo I – Relatório de estágio curricular

O estágio curricular para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária decorreu no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), numa carga horária total de 800 horas, entre 1 de novembro de 2016 e 19 de maio de 2017, em colaboração com o Projeto Linfoma Canino e os trabalhos de doutoramento da Dra. Joana Dias.

Durante o estágio, o autor teve a oportunidade de aprender a extrair ácidos nucleicos a partir das amostras biológicas, a fazer eletroforese em gel de agarose, praticar as técnicas de reação da polimerase em cadeia, clássica e em tempo real, purificar esses ácidos nucleicos e a avaliar a sequência dos mesmos. O autor também aprendeu a extrair proteína e os seguintes passos para proceder ao *immunoblotting*, desde realizar géis de poliacrilamida e SDS-PAGE, até à transferência para a membrana de nitrocelulose e incubação com anticorpos.

Houve ainda a possibilidade de assistir a diferentes atividades decorrentes no mesmo laboratório, como a manipulação da linha celular CLBL-1, e de preparar meios de cultura líquidos e sólidos para o desenvolvimento bacteriano. Por fim, foi possível desenvolver competências nos diferentes softwares, desde a análise estatística até à modelação tridimensional de moléculas.

O trabalho do autor desta dissertação feito durante o estágio curricular contribuiu para uma comunicação oral apresentada no XIII Congresso do Hospital Veterinário de Montenegro – Patologias Cardio-Respiratórias sem segredos, intitulada de “*Histone deacetylase inhibitors – a novel therapy for canine lymphoma*” apresentada pela Dra. Joana Dias (Anexo I).

O restante trabalho feito no estágio culminou nesta dissertação, e os seus dados permitiram contribuir para a elaboração de um artigo científico intitulado de “Characterization of the canine CD20 as a therapeutic target for comparative passive immunotherapy” (artigo em preparação).



## Capítulo II – Revisão bibliográfica

### 1. Linfoma não-Hodgkin humano

O cancro é uma das principais causas de morbilidade humana a nível mundial, havendo em 2012 mais de 32 milhões de doentes oncológicos e 14 milhões de novos casos. O cancro está em segundo lugar nas causas de mortalidade humana a nível mundial, com 8,8 milhões de mortes em 2015, ou seja, 13% das mortes desse ano. É ainda esperado que entre 2012 e 2032 haja um aumento de 70% na incidência dos cancros (Organização Mundial da Saúde [OMS], 2015), pelo que representa uma entidade patológica de alta relevância.

Uma das neoplasias mais prevalentes nos humanos é o linfoma não-Hodgkin (LNH), sendo um dos 10 tipos de cancro mais diagnosticados no mundo. (OMS, 2015). Segundo a Direção-Geral da Saúde (2016), em Portugal o linfoma não-Hodgkin teve uma incidência de 17,1 casos por cada 100 000 habitantes em 2010, e causou mais de 700 óbitos em 2015. Ainda mais relevante é que a incidência do linfoma não-Hodgkin duplicou nos últimos 30 anos e pensa-se que continuará a aumentar no futuro (Ito, Frantz & Modiano, 2014).

#### 1.1. Utilização do cão como modelo de estudo para o linfoma humano

Para o estudo de neoplasias linfóides com recurso a modelos animais, o mais comum é a implantação de células neoplásicas em ratinhos imunodeficientes, induzindo-lhes o desenvolvimento de tumores. A partir destes ratinhos pode-se estudar o desenvolvimento do tumor e as vias de sinalização influenciadas por oncogenes, tal como se pode testar novos fármacos e determinar as suas características farmacológicas *in vivo*. Neste modelo animal existem, porém, características que o distanciam da apresentação humana de linfoma: há falta de complexidade genética; falta também a interação do sistema imunitário com as células neoplásicas; não ocorre desenvolvimento tumoral em longos períodos, nem instabilidade genómica, nem forte heterogeneidade intratumoral. Por estas razões pode não haver correspondência entre alguns resultados obtidos experimentalmente nos murganhos e os efeitos observados em humanos (Paoloni & Khanna, 2008). O linfoma não-Hodgkin humano e o linfoma canino estão entre as doenças neoplásicas com maior homologia interespecies, e assim sendo considera-se que detêm grande potencial nos estudos de medicina comparada (Marconato, Gelain & Comazzi, 2012; Ito et al., 2014). Note-se, para efeitos de exemplo, que uma das primeiras utilizações do cão como modelo de estudos oncológicos foi na otimização do transplante de medula óssea em animais com linfoma, o que se veio a revelar uma grande mais-valia para os pacientes humanos. O linfoma canino ocorre espontaneamente e apresenta forte homologia biológica e epidemiológica com o LNH humano, incluindo as características histológicas, perfil genético, alvos moleculares, comportamento biológico e resposta a terapias convencionais. Tais semelhanças permitem o estudo interespecies da

ação dos oncogenes, dos fatores de risco ambientais comuns, compreender a biologia tumoral e a avaliação de novas terapias (Villarnovo, McCleary-Wheeler & Richards, 2017).

## **2. Linfoma canino**

O linfoma canino, também denominado como linfoma maligno canino ou linfossarcoma canino, engloba um grupo heterogêneo de neoplasias hematopoiéticas de origem linfóide, tendo origem em órgãos e tecidos sólidos como os linfonodos, outros órgãos linfóides, fígado, etc. (Nelson & Couto, 2014).

Os linfomas e as leucemias linfocíticas apresentam características celulares semelhantes e a sua distinção faz-se principalmente pela distribuição da carga tumoral, denominando-se leucemia se a expressão da doença ocorrer fortemente no sangue e na medula óssea (Seelig, Avery, Ehrhart & Linden, 2016).

O linfoma canino representa 90% dos casos de neoplasias hematopoiéticas e é a terceira neoplasia maligna mais frequente em cães (Marconato et al., 2012; Seelig et al., 2016). Também é o grupo de neoplasias em que o tratamento quimioterápico é mais relevante, sendo a principal doença tratada através de quimioterapia no Hospital Escolar Veterinário da FMV-UL.

### **2.1. Epidemiologia**

A incidência anual da doença é de 19,7 casos por cada 100.000 humanos e de 20 a 107 novos casos por cada 100.000 cães (Ito et al., 2014). Estima-se que em Portugal existam cerca de 2,5 milhões de cães (GfK, 2015), pelo que se pode prever um número elevado de cães com linfoma neste país. Nos humanos o linfoma não-Hodgkin corresponde a 4,3% de todos os cancros diagnosticados, enquanto que nos cães corresponde a mais de 6%. Entre outras características comuns às duas espécies está a predominância do linfoma de células B, correspondendo pelo menos a 70% dos casos (Zandvliet, 2016), sendo o linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) o subtipo mais frequente em ambas as espécies (Seelig et al., 2016).

Relativamente ao linfoma canino, apesar de os animais de todas as idades poderem apresentar a doença, a incidência aumenta com a idade, sendo mais frequente entre os 7 e os 10 anos de idade (Park et al., 2016). A prevalência da doença em machos e fêmeas é semelhante, contudo foi descrito um risco maior em fêmeas castradas (Villamil et al., 2009).

Não se conseguiu identificar uma causa individual para o linfoma canino, pelo que é considerado uma doença multifatorial. A sua incidência tem vindo a aumentar e é previsível que haja um forte impacto dos fatores ambientais na sua génese, sendo que o aumento da exposição a esses fatores ambientais coincidirá com o aumento do número de casos de linfoma. Entre os fatores de risco já identificados pode referir-se a residência em áreas industriais e a exposição a produtos químicos domésticos (Takashima-Uebelhoer et al., 2012),

a habitação próxima de locais com incineração de desperdícios, locais poluídos e com radioatividade (Marconato et al., 2009), assim como a exposição a campos magnéticos (Reif, Lower & Oqilvie, 1995).

Parece haver, ainda, uma relação entre esta neoplasia e os processos de desregulação imunitária, como a imunodepressão, a autoimunidade e a hipersensibilidade. Esta relação está mal estudada no cão, mas no ser humano já foi relatado o aparecimento de linfoma em doentes com síndrome de imunodeficiência adquirida ou submetidos a terapia imunodepressiva após transplantação (Zandvliet, 2016). Esta associação pode ser em parte explicada pela teoria da vigilância imunitária, que sugere que o organismo sofre frequentemente erros que levam à formação de células neoplásicas. No entanto, num indivíduo saudável, essas serão rapidamente reconhecidas e destruídas pelo sistema imunitário, ou seja, só as células neoplásicas capazes de escapar ao reconhecimento imunitário é que podem levar ao aparecimento de doença (Tizard, 2013c).

Reconhece-se, por fim, a influência genética na origem da doença, nomeadamente pela ocorrência familiar e a agregação de tipos específicos de linfoma em certas raças, como Rottweiler, Scottish terrier e Bullmastiff. Outras raças com aparente predisposição são o Boxer, Basset hound, Bulldog, Labrador retriever, Airedale terrier e São Bernardo (Morris & Dobson, 2001).

## **2.2. Apresentação clínica**

A Organização Mundial de Saúde publicou, em 1980, uma guia de classificação onde se descreve os estádios clínicos do linfoma e da leucemia linfóide em animais domésticos. Neste documento foram definidas 5 formas anatómicas de linfoma (Owen, 1980), e atualmente divide-se a doença em linfoma multicêntrico, linfoma mediastinal cranial, linfoma gastrointestinal, linfoma cutâneo e linfomas atípicos, estando incluídos neste último grupo as formas hepática, ocular, do sistema nervoso, pulmonar entre outras. A apresentação clínica mais comum é a multicêntrica, e constitui 75% dos casos de linfoma canino (Zandvliet, 2016), estando o estadiamento clínico do linfoma caracterizado na Tabela 1.

## **2.3. Diagnóstico e estadiamento**

O diagnóstico da doença e o seu estadiamento e subestadiamento são de grande relevância, uma vez que, dependendo do linfoma, o prognóstico pode ser bastante variável e a terapêutica a aplicar também poderá ser mais ou menos eficaz. Assim sendo, o diagnóstico deverá ser feito com um exame físico completo, hemograma, análises bioquímicas e urianálise (Vail & Young, 2007).

Tabela 1: Estadiamento clínico para linfoma nos animais domésticos da OMS (1980).

Estádio	Características
I	Apenas um linfonodo/órgão está afetado (excluindo a medula óssea)
II	Envolvimento regional de mais do que um linfonodo
III	Envolvimento generalizado dos linfonodos
IV	Estádio I-III acompanhado de envolvimento do fígado e/ou baço
V	Estádio I-IV acompanhado de manifestações no sangue ou envolvimento da medula óssea e/ou outros órgãos
Subestádio	
a	Ausência de sintomas sistêmicos
b	Presença de sintomas sistêmicos

### 2.3.1. Análises laboratoriais

As análises bioquímicas e o hemograma são uma prática rotineira e podem mostrar uma panóplia de alterações não específicas nos animais. No eritrograma, o mais comum é haver anemia ligeira, mas muitas vezes as contagens de eritrócitos estão normais (Durno 2011). Também se podem observar anomalias morfológicas das hemácias, estando descrita a presença de esquizócitos, acantócitos e excentrócitos. No leucograma podemos encontrar desde leucopénia a leucocitose, mas mais frequentemente se encontra contagens normais dos leucócitos. O resultado do trombograma também é variável, sendo a trombocitopénia comum e a trombocitose incomum. A maioria dos animais apresenta uma tendência persistente para a hipercoagulabilidade. O envolvimento da medula óssea sem alterações hematológicas pode ocorrer em 55% dos cães, sendo recomendável o seu diagnóstico citológico por punção aspirativa (Zandvliet, 2016).

### 2.3.2. Citologia, histologia e imunofenotipagem

A punção aspirativa de agulha fina é uma técnica minimamente invasiva e permite uma análise citológica com avaliação ótima do índice mitótico e da dimensão e morfologia do núcleo, tendo alta sensibilidade para o diagnóstico de linfoma canino de alto grau. Pode, no entanto, não ser suficiente para o diagnóstico definitivo, nomeadamente em linfoma de baixo grau. A análise histológica de tecido biopsiado é a técnica mais indicada para a caracterização da população neoplásica em relação ao seu padrão de crescimento e ao imunofenótipo.

A imunofenotipagem pode ser feita através da histologia, por citologia em lâmina de vidro ou por citometria de fluxo, e são comumente utilizados anticorpos contra o CD20, o CD21, o CD79 $\alpha$  e o PAX-5, para o linfoma B canino, ou contra o CD3, o CD4 ou o CD8 para o linfoma T canino. A proporção imunofenotípica ronda os 70% de linfomas de células B e 30% de linfomas de células T, no entanto, cerca de 5% a 20% dos casos de linfoma canino não são classificados como B nem como T (Faldyna et al., 2007).

Sabe-se que a população neoplásica é clonal, no entanto há frequentemente heterogeneidade dentro do próprio tumor e as várias populações metastáticas no mesmo animal podem ter comportamentos e perfis moleculares distintos. A classificação em linfoma de células B ou T pode não ser suficiente para prever o comportamento e a agressividade tumoral, e por esta razão a abordagem dos investigadores é, cada vez mais, a análise massiva dos perfis moleculares de um grande número de doentes, com o objetivo de identificar alterações comuns a todas populações celulares da mesma doença (Karmali & Gordon, 2017).

### **2.3.3. Perfil Molecular**

No linfoma canino a expressão de tirosina quinase é geralmente baixa, mas nalguns linfomas T de alto grau esta surge sobreexpressa. Relativamente ao gene antiapoptótico *Bcl-2* a expressão é variável, no entanto há uma tendência para a sobreexpressão em linfoma B, especialmente em DLBCL. No DLBCL também está descrita a sobreexpressão do gene *Myc* e a expressão constitutiva do fator nuclear  $\kappa B$  (Zandvliet, 2016; Curran et al., 2017).

### **2.3.4. Imagiologia**

A imagiologia é útil no estadiamento da doença, para determinar a extensão e localização das lesões, e também serve para indiciar qual o tipo de doença, mas não tem um forte valor diagnóstico, pois não permite distinguir hiperplasia de neoplasia nem distinguir entre os vários tipos de tumores. A radiografia torácica apresenta alterações em cerca de 70% dos casos, não sendo incomum ver-se infiltrados pulmonares, linfadenopatias e massas mediastinais craniais, no entanto estas são frequentemente inespecíficas e insuficientes para o diagnóstico de linfoma canino (Starrak 1997). A TAC permite uma visualização ótima das lesões, mas tal como a radiografia convencional, possui algumas limitações no diagnóstico de linfoma (Zandvliet, 2016).

## **2.4. Radioterapia**

Apesar das neoplasias linfóides serem sensíveis à radioterapia, a expressão sistêmica do linfoma canino diminui a sua viabilidade como opção terapêutica. Ainda assim, há estudos que relatam a irradiação de corpo inteiro como uma opção viável, após quimioterapia. Há ainda estudos relativos à radioterapia seguida de transplante de células estaminais hematopoiéticas, mas o potencial desta terapêutica ainda terá de ser avaliado com maior profundidade (Marconato et al., 2012; Zandvliet, 2016).

## **2.5. Quimioterapia**

Semelhantemente ao que se verifica em humanos, no cão o protocolo quimioterápico de indução mais utilizado para o tratamento de linfoma passa pela combinação de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona (CHOP), sendo frequente adicionar-se L-asparaginase (L-CHOP). Este protocolo induz remissão em 80% a 90% dos cães e está associado a maiores períodos de remissão e tempo de sobrevida, relativamente a protocolos só com um fármaco (Marconato et al., 2012; Nelson & Couto, 2014).

Na ausência de tratamento a maioria dos cães com linfoma multicêntrico vive 4 a 6 semanas após o diagnóstico (Ito, Brewer, Modiano & Beall 2015). Apesar das vantagens advindas do desenvolvimento do CHOP, a terapia raramente é curativa, e o principal objetivo é induzir remissões longas mantendo a qualidade de vida do animal. Ainda assim, os tempos de remissão são relativamente curtos, durando em média entre 6 a 11 meses (Marconato et al., 2012). Apenas metade dos animais tratados com CHOP sobrevive 1 ano, e somente 10% atinge os 2 anos de sobrevida (Ito et al., 2015).

No linfoma B canino parece não haver vantagens na administração de terapia de manutenção tendo em conta a toxicidade adicional. O linfoma T é consideravelmente menos responsivo ao CHOP que o linfoma B, pelo que é recomendado um tratamento mais agressivo, incluindo quimioterapia de manutenção. O fenótipo representa, então, um fator de prognóstico importante, e para o linfoma T podem ser escolhidos protocolos quimioterápicos alternativos, como o DMAC (dexametasona, melfalano, actinomicina D e citosina arabinósido), o MOPP (clorometina, vincristina, procarbazina e prednisona), entre outros (Marconato et al., 2012; National Canine Cancer Foundation, 2015).

Em medicina veterinária a quimioterapia é administrada em doses relativamente baixas, e por isso a toxicidade é controlada. O principal fator limitante no tratamento do linfoma canino é a resistência à quimioterapia, crescente a cada recidiva (Zandvliet, 2016), facto que é agravado pela falta de alternativas eficazes. A alternativa proposta nesta dissertação é a imunoterapia.

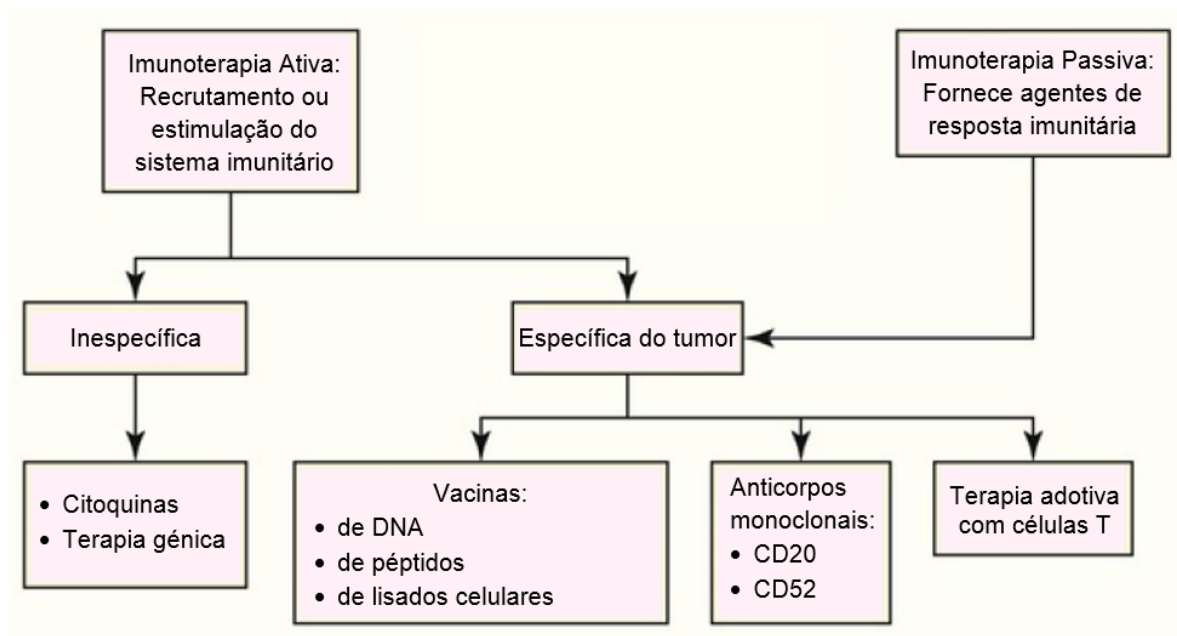
### 3. Imunoterapia

Nas últimas décadas tem surgido um forte interesse na imunoterapia oncológica em medicina veterinária, o que é uma consequência direta do seu sucesso em humanos. Após o surgimento de resistências à quimioterapia, à falta de outros protocolos quimioterápicos eficazes, pode ser utilizada a imunoterapia numa tentativa de induzir nova remissão porque o seu mecanismo de ação difere do da quimioterapia, tópico este que será abordado em seguida.

O princípio da imunoterapia consiste na utilização de ferramentas já existentes no sistema imunitário, que se encontra frequentemente debilitado, na luta contra as neoplasias (Tizard, 2013c). O seu potencial prende-se na capacidade de atacar as células neoplásicas ou o microambiente tumoral, com poucos efeitos adversos para os tecidos normais. As células do sistema imunitário têm ainda a capacidade de circular pelos tecidos do organismo para atingir os tumores, podendo ainda providenciar uma memória imunológica de longa duração que atrase ou até previna o desenvolvimento da doença.

Esta forma terapêutica tem diferentes abordagens possíveis. Assim, divide-se a imunoterapia em passiva e ativa (Figura 1), distinguindo-se as duas pelo recrutamento direto, ou não, de resposta imunitária (Anderson & Modiano, 2015; Ettinger, Feldman & Côté, 2016). A presente dissertação irá focar-se na imunoterapia passiva.

Figura 1: Imunoterapia antineoplásica em medicina veterinária. Retirado de Ettinger, Feldman & Côté, 2016.



Refira-se que é relativamente comum o surgimento de resistência à imunoterapia por parte das células neoplásicas, quer seja através da subexpressão dos antígenos-alvo quer pela alteração das vias de sinalização dominantes, pelo que Anderson e Modiano (2015) sugerem que a utilização adequada da imunoterapia incluirá uma conjugação com quimioterapia ou radioterapia.

### **3.1. Imunoterapia ativa**

O sistema imunitário exerce pressão evolutiva sobre as células neoplásicas, pelo que se se formar um tumor e este se desenvolver, as suas células constituintes já terão mecanismos de fuga imunitária: apresentam poucos antígenos imunogénicos, exibem proteínas indutoras de exaustão imunitária e até o microambiente tumoral contribui para uma intensa imunodepressão local (Tizard, 2013c; Anderson & Modiano, 2015; Allegra, Innao, Gerace, Vaddinelli & Musolino, 2016). A maior parte das técnicas de imunoterapia ativa foca-se no tumor primário, promovendo a sua inflamação e necrose. Para a ativação da imunidade adquirida é necessário um processamento dos resíduos libertados pela necrose e da apresentação desses antígenos a linfócitos T, resultando na sua ativação e proliferação. Muitas das técnicas desta categoria, por estimularem a imunidade adquirida, promovem uma imunidade prolongada mantida pelos linfócitos de memória (Anderson & Modiano, 2015). Alguns exemplos de imunoterapia ativa são a administração de bactérias anaeróbias atenuadas, de vírus oncolíticos e a vacinação com componentes do tumor (Gavazza et al., 2013; Gentshev et al., 2014; O'Connor & Wilson-Robles, 2014).

### **3.2. Imunoterapia passiva**

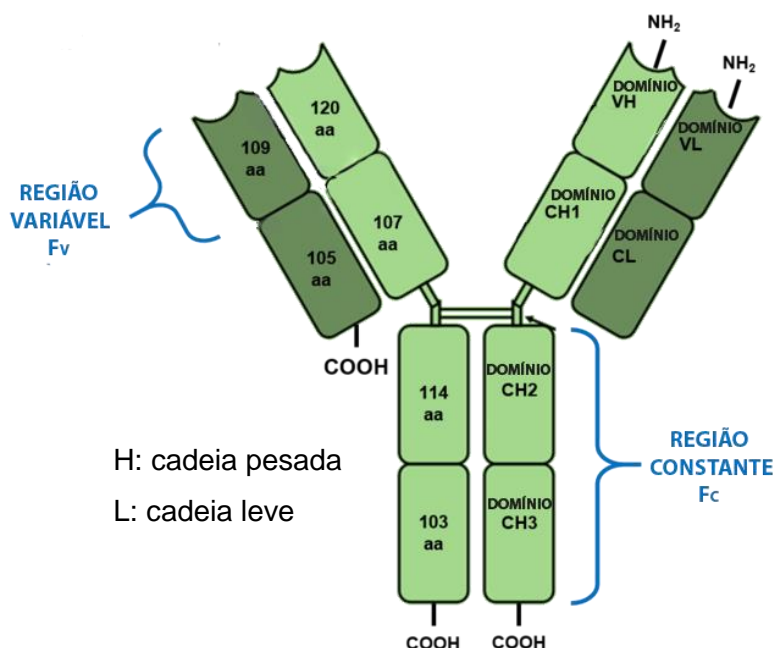
Tendo algum paralelismo com a imunidade passiva, a imunoterapia passiva consiste na administração de imunoglobulinas ou outros componentes imunitários que complementem a imunidade do animal.

#### **3.2.1. Imunoglobulinas**

Os anticorpos, produzidos pelos plasmócitos, desempenham funções de grande importância no sistema imunitário, sendo as imunoglobulinas-G (IgG) o isótipo predominante na circulação sanguínea. As IgG convencionais apresentam a forma de “Y” e são constituídas por duas cadeias leves, cada uma com dois domínios, e duas cadeias pesadas, cada uma com quatro domínios (Figura 2). O fragmento variável (Fv) do anticorpo (Ac) determina a sua alta especificidade em relação a um epítopo de um antígeno (Ag). Por sua vez o fragmento cristalizável (Fc), que é constituído pelos domínios constantes 2 e 3 da cadeia pesada, permite a ligação de moléculas do complemento ou de células do sistema imunitário (Tizard, 2013b).



Figura 2: Estrutura da imunoglobulina-G. Adaptado de Wikimedia Commons, 2013.



### 3.2.1.1. Anticorpos monoclonais

Data o ano de 1982 em que pela primeira vez se recorreu a anticorpos monoclonais (mAb) murinos no combate à leucemia e linfoma humano. Com o desenvolvimento tecnológico e científico produziu-se, em 1987, uma imunoglobulina-G1 quimérica destinada para o tratamento de linfoma e leucemia de células B, tendo região variável murina e o Fc humano, e tendo como antígeno-alvo o CD20 humano. Foi só em novembro de 1997 que a FDA aprovou este fármaco, o rituximab, sendo o primeiro mAb aprovado para fins médicos (LeBien & Tedder, 2008; Engelhard, 2016). A utilização do rituximab resultou no aumento consistente do número de remissões com toxicidade mínima, pelo que a imunoterapia passou a fazer parte dos principais tratamentos oncológicos em medicina humana (Glennie, Honeychurch, French & Tutt, 2000). A utilização conjunta do rituximab com o protocolo CHOP (R-CHOP) induz a remissão completa em 72% dos casos de DLBCL humano e, comparativamente com a terapia CHOP, o R-CHOP diminui para metade os casos de recidiva e de morte causada pela doença (Mian et al., 2014). Atualmente, os principais métodos de produção de mAb são o hibridoma e a técnica de *phage display* (Carter, Smith & Ryan, 2004).

### 3.2.1.2. Efeitos terapêuticos dos anticorpos monoclonais

Existem anticorpos simples (Figura 2) e anticorpos modificados, e as suas variantes serão explicadas posteriormente. No caso dos anticorpos monoclonais simples, ou não modificados, assumem-se quatro possíveis modos de ação antitumoral na imunoterapia, e são eles a citotoxicidade dependente do complemento (CDC), a citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por células (ADCC), o efeito direto quer pela indução de apoptose ou apenas inibição

do desenvolvimento celular, e a estimulação da imunidade adquirida (Siegel, Goldenberg, Cesano, Coleman & Leonard, 2003). Quando se planeia o desenvolvimento de um anticorpo define-se que tipo de ação direta se pretende, ao se escolher o antígeno-alvo. Há três tipos diferentes de alvos para anticorpos: os que se encontram na superfície da célula neoplásica, os do estroma do tumor, e os *immune checkpoints*. Os anticorpos contra os primeiros produzem efeitos diretamente nas células malignas, contra os segundos inibem a promoção do crescimento tumoral induzido pelo ambiente tumoral, e contra os terceiros reverterem o processo de dessensibilização que as células imunitárias sofreram em relação às células neoplásicas (Carter et al., 2004).

Um exemplo recente de grande sucesso é a utilização simultânea, num modelo murino de linfoma canino, de anticorpos contra o CD20, proteína específica de células B, e o bloqueio do CD47, uma molécula *immune checkpoint* expressa no linfoma canino. Os investigadores verificaram que esta combinação é sinérgica, pois promoveu grandemente a fagocitose e resultou na remissão completa e sem vestígios microscópicos de tumor em todos os animais estudados (Weiskopf et al., 2016).

#### **3.2.1.3. Anticorpos modificados**

Sendo possível alterar a estrutura e a composição dos anticorpos, criou-se outros tipos de imunoglobulinas com diferentes funções e mecanismos de ação. É então possível desenhar anticorpos com dupla e tripla especificidade, o que permite bloquear múltiplos antígenos em simultâneo ou, por exemplo, provocar a adesão entre uma célula citotóxica e uma célula tumoral, bastando para isso que possua um dos Fv contra o CD3, para linfócitos T, ou contra o CD16 das células *Natural Killer* (Anderson & Modiano, 2015).

Outro formato que importa referir é o anticorpo conjugado com fármaco (ADC), que consiste numa imunoglobulina que tem acoplada um fármaco quimioterápico ou um isótopo radioativo. Os ADC revolucionam os mecanismos de entrega direta de fármacos às células tumorais, pois ao terem como alvo proteínas que internalizam, os complexos Ag-Ac podem ser degradados no citosol, e ocorre libertação do fármaco ou radioisótopo no interior da célula neoplásica (Berguig et al., 2015).

#### **3.2.2. Transferência adotiva de linfócitos T**

Esta terapia consiste na transferência autóloga de linfócitos sensibilizados *ex vivo* e é muito específica e personalizada, apesar de ser uma técnica mais morosa que as outras.

A transferência adotiva de linfócitos T (TALT) apresenta melhores resultados após tratamento com quimioterapia ou radioterapia. Pensa-se que a depleção celular de linfócitos anérgicos e dos linfócitos T reguladores permite que as células transplantadas proliferem sem que haja imunodepressão ou competição por citocinas e fatores de crescimento (Allegra et al., 2016).

Sabe-se que após a quimioterapia, o prognóstico é mais positivo quanto melhor for a recuperação do número de células T. Os cães tratados com o protocolo CHOP e com TALT de uma população policlonal de células T, comparando com cães tratados só com a quimioterapia, sobreviveram mais tempo e estiveram mais tempo livres de tumor: 392 dias *versus* 167 dias e 338 *versus* 71 dias, respetivamente (O'Connor et al., 2012).

A quimioterapia e a radioterapia podem levar à expressão de novos antígenos por parte das células tumorais, isto é, antígenos não-*self* (Klingemann, 2018). Estes novos antígenos têm o potencial de estimular a imunidade adquirida, fenómeno que mais dificilmente ocorre após a depleção linfocitária se não houver uma reconstituição populacional através de TALT, sendo mais um benefício da combinação das duas formas terapêuticas (O'Connor & Wilson-Robles, 2014).

Considera-se que há três subtipos de transferências adotivas específicas com potencial para imunoterapia, utilizando-se: 1) linfócitos infiltrados no tumor, 2) linfócitos T com o recetor de células T (TCR) geneticamente modificado e 3) linfócitos T com recetor de antígeno quimérico (CAR-T). O subtipo 1) pressupõe que uma porção dos leucócitos presentes no estroma tumoral é capaz de produzir resposta antitumoral, mas que sofreu “exaustão imunitária”. O objetivo desta TALT é cultivar células de tumores sólidos *ex vivo*, isolar e estimular os linfócitos anteriormente exaustos com interleucina-2, revertendo a exaustão, e inoculá-los de novo no animal (Anderson & Modiano, 2015).

Com recurso à engenharia genética pode transferir-se genes para linfócitos T recolhidos do sangue periférico. Assim surge o subtipo 2) de transferência adotiva, no qual se adicionam genes que codificam um TCR alternativo e cujo alvo seja um péptido tumoral previamente determinado. Esta técnica permite uma ligação de alta afinidade (Rosenberg & Restifo, 2015). A estimulação do TCR depende do processamento dos péptidos tumorais e da sua apresentação mediada pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC), o que constitui uma desvantagem na imunidade antitumoral porque várias neoplasias conseguem diminuir a expressão de MHC das células apresentadoras de antígeno (APC) (O'Connor & Wilson-Robles, 2014). Surge em 1993 o subtipo 3) (Wang, Wei & Liu, 2012), no qual também se transfere genes para linfócitos T, mas neste caso os recetores são “quiméricos”, isto é, os recetores são compostos pela região variável de um anticorpo, mas possuem uma região intracelular de ancoragem. Este último pode ser desenhado com várias combinações possíveis de domínios de vias de sinalização da ativação dos linfócitos T. O recetor quimérico age independentemente do MHC e pode ligar-se diretamente aos antígenos do tumor (O'Connor & Wilson-Robles, 2014).

Para neoplasias humanas de células B, a terapia com CAR-T anti-CD19 foi o que apresentou resultados mais satisfatórios em ensaios clínicos, havendo grande expansão clonal e uma manutenção do número destes linfócitos que perdurou por 6 meses. Nestes ensaios clínicos

a toxicidade traduziu-se somente por aplasia de células B e hipogamaglobulinémia (Porter, Levine, Kalos, Bagg & June, 2011).

Nalguns casos a terapia com CAR-T pode resultar em fenómenos exagerados de inflamação ou de autoimunidade contra órgãos vitais, podendo levar à morte dos animais (June, Warshauer & Bluestone, 2017).

De entre as imunoterapias mencionadas, as que possuem maior especificidade inerente são a terapia com CAR-T e a terapia com anticorpos monoclonais, sendo que ambas têm como alvos proteínas específicas do tumor. Tendo em consideração a importância da imunoterapia no tratamento do linfoma humano, e com vista ao possível desenvolvimento da mesma para o linfoma canino, é necessário primeiramente identificar e validar proteínas que possam ser alvos de imunoterapia no cão (Ito et al., 2015; Klingemann, 2018). Assim sendo, o estudo dos alvos da imunoterapia é o foco principal da presente dissertação.

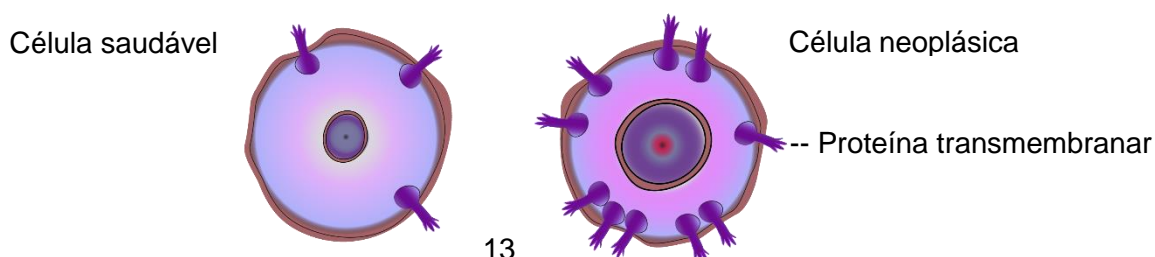
### 3.3. Alvos da imunoterapia

Os sucessos na terapia com anticorpos levaram ao aumento da investigação para identificação e validação de novos alvos de imunoterapia, focando especialmente nas proteínas da superfície das células neoplásicas. As células neoplásicas de tumores linfóides são mais expostas aos anticorpos que as dos restantes tumores, mas esta terapia parece ser mais eficaz em leucemias do que em linfomas. Um exemplo deste facto é o da utilização, em humanos com leucemia mieloide aguda, de um anticorpo anti-CD33, o gemtuzumab, que se combinou com ozogamicina, e que demonstrou efeitos terapêuticos até a um limite de  $10^{3,5}$  a  $10^4$  moléculas de CD33 por célula (Tanimoto et al., 1989). Por sua vez, em LNH humano, bastam  $10^5$  moléculas de CD20 por célula B para o rituximab induzir atividade antitumoral (Glennie & van de Winkel, 2003).

Deve-se começar por definir as características desejáveis do alvo, pois representa um ponto de partida que direciona a pesquisa para um alvo ou para outro. As características de um alvo ideal na terapia antineoplásica com anticorpos são as seguintes (Carter et al., 2004):

1. Ser expresso à superfície da célula;
2. Ter uma expressão abundante e homogênea em todas as células neoplásicas;
3. Estar ausente ou ter pouca expressão em células saudáveis dos indivíduos;
4. Ser internalizado quando se liga ao anticorpo, se se pretende usar um ADC.

Figura 3: Ilustração de uma célula saudável e de uma célula neoplásica com sobreexpressão de uma proteína transmembranar.



É possível, no entanto, atingir resultados satisfatórios sem que sejam preenchidos todos estes requisitos, e já foram aprovados, para uso clínico, vários anticorpos contra alvos que se revelaram uma nova esperança na luta contra o cancro. Referem-se alguns anticorpos monoclonais mais relevantes em medicina humana, como é o caso do rituximab, cujo alvo é o CD20, e que está indicado para vários subtipos de Linfoma não-Hodgkin de células B, leucemia linfocítica crónica e algumas doenças autoimunes, e o alemtuzumab, utilizado em Linfoma não-Hodgkin de células T e leucemias linfocíticas crónicas que expressem CD52 (Glennie & van de Winkel, 2003).

Atualmente exploram-se alvos diferentes e há interesse em investigar anticorpos cujos alvos diretos não são as células neoplásicas, mas sim moléculas envolvidas na angiogénese tumoral, proteínas na matriz extracelular e fatores solúveis (Carter et al., 2004).

Definido o conceito de alvo ideal, existem 4 etapas principais para a identificação e validação de novos alvos para imunoterapia com anticorpos (Carter et al., 2004). A primeira das quatro etapas é a obtenção de amostras, no qual se deve adquirir material biológico das células doentes e das células saudáveis homólogas, para que seja possível comparar as diferenças de expressão antigénica. Podem ser utilizadas linhas celulares ou tecidos extraídos de pacientes, se possível isolando as células neoplásicas.

Na segunda etapa, de modo a identificar potenciais alvos, procura-se diferenças entre o material das células neoplásicas e o das saudáveis. As diferenças podem ser genómicas, transcriptómicas, proteómicas, entre outras. As técnicas usadas para o estudo das diferenças no DNA genómico podem ser, por exemplo, a hibridação fluorescente/cromogénica *in situ* e a hibridação comparativa genómica; para análise da expressão de mRNA utilizam-se as técnicas de *microarray* e PCR quantitativa em tempo real, entre outras; para a avaliação de proteína é comum o uso de técnicas de eletroforese e de imunohistoquímica, havendo outras técnicas alternativas.

A terceira das etapas é a validação dos antigénios de interesse, no qual se recorre à produção de anticorpos para avaliar a expressão real de antigénio e, mais uma vez, comparar as populações doentes e saudáveis. Esta etapa pode passar também pela quantificação de mRNA, mas os resultados dessa abordagem devem ser comparados com a quantificação proteica, uma vez que nos estudos em grande escala não há concordância entre a expressão de mRNA e de proteína em 20% a 83% dos genes estudados (Chen et al., 2002; Tian et al., 2004).

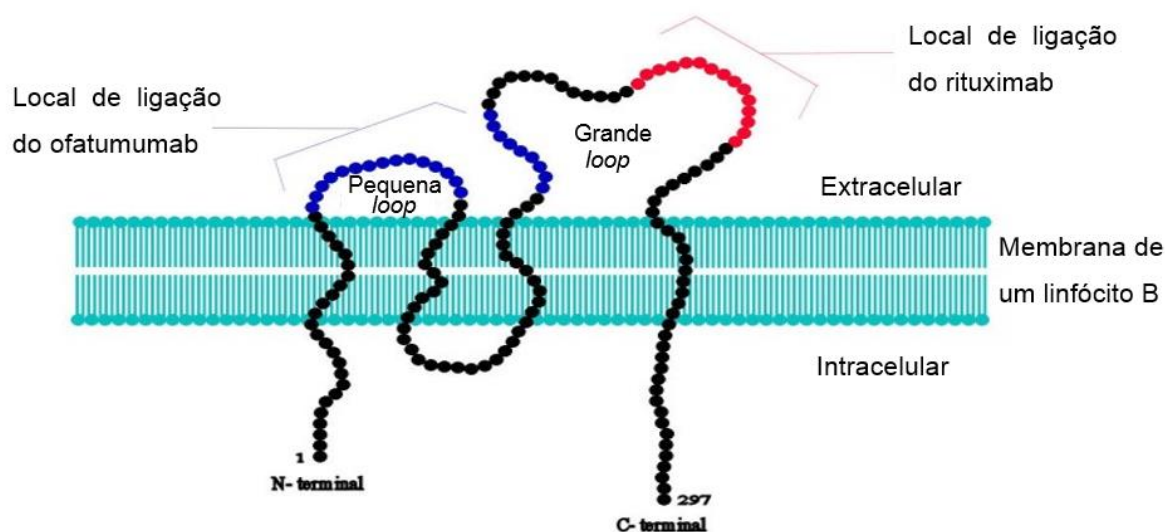
A quarta e última etapa consiste na avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de um extenso painel de anticorpos contra os antigénios de interesse. Nesta etapa pretende-se determinar quais são, se existentes, os efeitos de cada anticorpo nas células, e adequar a escolha do anticorpo consoante as particularidades do tumor e do tratamento pretendido.

Tendo em conta a grande predominância dos linfomas de células B sobre os de células T, a presente dissertação irá incidir no estudo de recetores típicos de células B que tenham aparente potencial como alvos de imunoterapia para linfoma B, como são o CD19, o CD20, o CD21, o CD22, o CD74 e o CD80 (Glennie et al., 2000). De seguida será feita uma breve descrição das proteínas aqui referidas, assim como de imunoterapias dirigidas às mesmas.

### 3.3.1. CD20

O CD20 é uma fosfoproteína não-glicosilada hidrofóbica de 35 kDa à qual não se reconhece nenhum ligando. Pertence ainda à superfamília das tetraspaninas, que são proteínas transmembranares com as extremidades amina e carboxilo intracelulares, têm 4 domínios transmembranares helicoidais e 2 *loops* extracelulares, sendo a primeira *loop* muito reduzida e a segunda consideravelmente maior (Figura 4). O CD20 canino apresenta uma estrutura e função semelhante ao humano, tendo sequência comum em 73% dos nucleótidos, o que corresponde a uma homologia de 82% nos resíduos de aminoácidos (Kano et al., 2005; Ito et al., 2015).

Figura 4: Molécula de CD20 com realce dos locais de ligação de dois mAbs. Retirado de Cang, Mukhi, Wang & Liu, 2012.



Esta proteína transmembranar é expressa na grande maioria das células B saudáveis e neoplásicas, das quais é quase exclusiva, mas não está presente nas células estaminais, nas células pró-B, nem nos plasmócitos. Sabe-se que a maioria das linhas de celulares de neoplasias de células B tem  $10^5$  a  $2 \times 10^5$  moléculas de CD20 por célula (Jubala et al., 2005; Kano et al., 2005; Youinou, Mankaï, Bordron & Berthou, 2008; Seelig et al., 2016). Exceccionalmente pode ser expresso em formas aberrantes de neoplasias de células T (Cragg, Walshe, Ivanov & Glennie, 2005).

Relativamente à disposição na membrana, algumas experiências sugerem que o CD20 se acumula em forma de dímeros e tetrâmeros em estruturas relativamente rígidas denominadas *lipid rafts*, e que está frequentemente associado ao CD40, ao MHC de classe II e ao recetor de células B (BCR) em linfócitos *naïfs* (Cragg et al., 2005).

Apesar de ainda não se ter determinado o modo de ação, alguns estudos sugerem que esta proteína possa desempenhar funções no controlo do fluxo de cálcio. Foi demonstrada uma relação proporcional entre a expressão de CD20 e os níveis basais de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, cujo aumento persistente é necessário para a ativação das células B. Por outro lado, a estrutura e disposição do CD20 também fornecem indícios sobre a sua função, pois por ser uma tetraspanina agrupada em oligómeros pode permitir a formação de canais transmembranares, hipótese reforçada por apresentar uma estrutura semelhante a outros canais de cálcio já conhecidos. Numa tentativa de avaliar a sua função, foram realizados estudos em linhas celulares com anticorpos anti-CD20 que originaram resultados confusos, uma vez que consoante o anticorpo, os efeitos observados variaram entre aumento da sobrevivência, ativação e proliferação, inibição do desenvolvimento celular ou morte celular. Assim sendo, existe atualmente o consenso de que a função do CD20 é iniciar a entrada de cálcio, após estimulação antigénica do BCR, de modo a desencadear a ativação e proliferação dos linfócitos B (Cragg et al., 2005).

#### **3.3.1.1. Imunoterapia direcionada ao CD20 humano**

Para além dos benefícios, anteriormente referidos, da introdução do rituximab no protocolo de quimioterapia, este possui a vantagem de ser eficaz tanto em linfoma alto grau, como de baixo grau, desde que haja expressão de CD20 (Cragg et al., 2005). Pensa-se, ainda, que o rituximab aumenta a sensibilidade das células à radioterapia e à quimioterapia, estando potenciado o efeito terapêutico (Engelhard 2016).

O rituximab exerce a sua ação maioritariamente através da CDC e ADCC, sendo necessário para este efeito que possua a região Fc. Para a CDC obtém-se melhores resultados quando num local da membrana celular se encontram concentrados um grande número de complexos Ag-Ac, situação que está facilitada pela acumulação de CD20 nos *lipid rafts*. Este anticorpo também é capaz de induzir a morte celular sem a presença de complemento ou células citotóxicas, e neste caso não é essencial um Fc, bastando que ocorram extensas ligações cruzadas e o desencadeamento da apoptose por ativação da via das caspases (Cragg et al., 2005). Após ligação ao anticorpo, o CD20 mantém-se na superfície celular, estando descrito um nível muito baixo de internalização (Jubala et al., 2005; Gabellier & Cartron, 2016). Esta característica é uma limitação para a terapia com ADC, mas revela-se altamente vantajoso para a CDC e ADCC (Cragg et al., 2005).

Cerca de 29% dos pacientes humanos com linfoma que são tratados com rituximab sofrem recidiva ou têm tumores resistentes ao tratamento (Hiraga et al., 2009). A resistência ao

rituximab poderá ser derivada de variados fatores, sendo um deles as características do próprio anticorpo monoclonal. Mais recentemente, e numa tentativa de ultrapassar as limitações do rituximab, tem sido desenvolvida uma nova geração de anticorpos monoclonais, da qual faz parte o obinutuzumab, e que apresenta como vantagens os fenómenos aumentados de ADCC e a forte indução de morte celular independente da ativação da via das caspases. O obinutuzumab já foi testado em ensaios clínicos de fase III de linfomas CD20<sup>+</sup> refratários ao rituximab, tendo proporcionado altas taxas de remissão prolongada (Gabellier & Cartron, 2016).

### **3.3.1.2. Imunoterapia direcionada ao CD20 canino**

Jubala e colaboradores (2005) testaram, em linfócitos B caninos, a ligação de vários anticorpos, incluindo o rituximab, feitos contra as porções extracelulares do CD20 murino ( $n=12$ ) e humano ( $n=28$ ), no entanto, nenhum dos 40 anticorpos se ligou ao CD20 canino. A ausência de ligação do rituximab ao CD20 canino torna-o inútil na imunoterapia de linfoma canino, e pensa-se que esta falha na ligação antígeno-anticorpo seja consequência da falta de homologia entre o cão e o Homem no epítipo na grande *loop* do CD20 (Impellizeri, Howell, McKeever e Crow, 2006). Assim sendo, tornou-se necessário desenvolver anticorpos específicos para as porções extracelulares do CD20 canino (Jubala et al., 2005). Nos últimos anos têm sido desenvolvidos anticorpos quiméricos direcionados aos domínios extracelulares do CD20 canino, tendo alguns destes demonstrado potencial terapêutico. Um deles, já aqui referido, foi utilizado num modelo murino de DLBCL canino em conjunto com o bloqueio do CD47 (Rue et al., 2015; Weiskopf et al., 2016). Existe, entre outros anticorpos anti-CD20 canino, um que, apesar de não induzir a morte celular direta nem a CDC, promove a fagocitose mediada por macrófagos e a ADCC em células de linfoma B canino (Ito et al., 2015).

Já estão a ser estudados protocolos terapêuticos que combinam quimioterapia e imunoterapia anti-CD20 para o linfoma canino de células B. Num desses estudos os cães foram tratados com L-CHOP e anticorpos anti-CD20, havendo remissão completa em 96% dos animais ( $n=27$ ), e sendo o tempo mediano de sobrevida o dobro relativamente aos cães tratados só com L-CHOP. Num outro estudo, tratando os animais com doxorrubicina e anticorpos anti-CD20, atingiu-se a remissão completa em 75% dos casos ( $n=12$ ) e o período livre de doença aumentou 50% relativamente aos animais tratados só com doxorrubicina (Ayl & Ohashi, 2015; Anderson & Modiano, 2015).

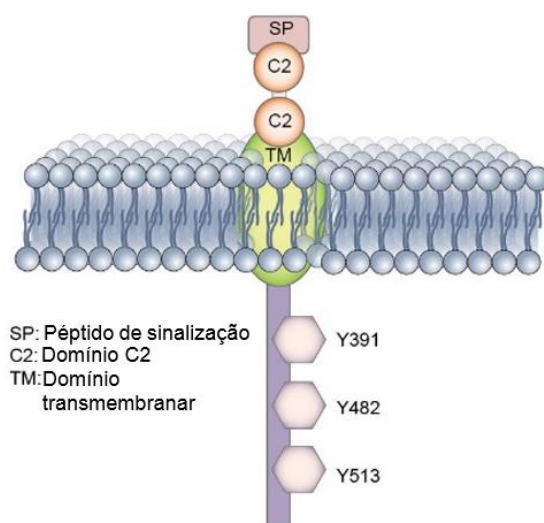
Testou-se recentemente o desenvolvimento de CAR-T anti-CD20 e a sua utilização num cão com linfoma B. Apesar de matar as células CD20<sup>+</sup> *in vitro*, a sua eficácia *in vivo* revelou-se bastante moderada, pelo que será necessário otimizar a produção de CAR-T (Panjwani & Smith et al., 2016).



### 3.3.2. CD19

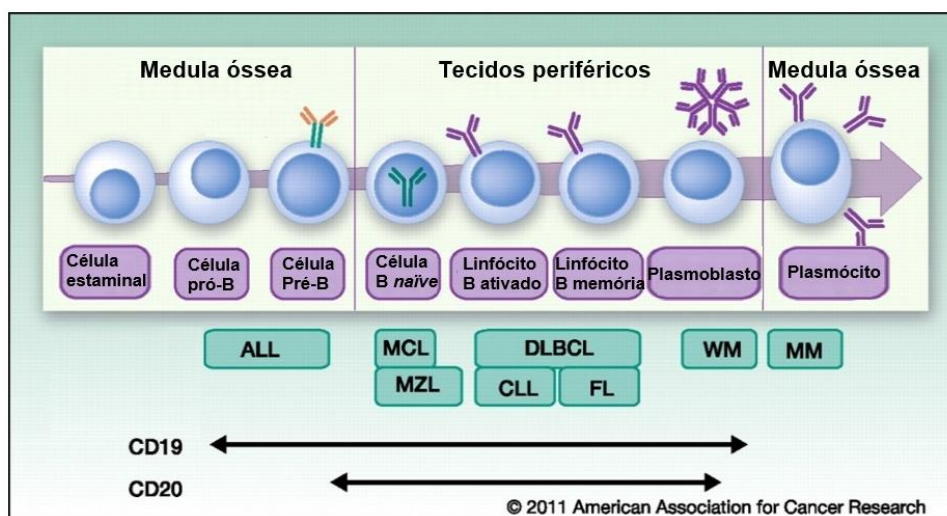
O CD19 humano é uma glicoproteína constituída por 556 resíduos de aminoácidos, com um peso molecular de 95 kDa, e que faz parte da superfamília das Imunoglobulinas. Pertence ao tipo I de proteínas transmembranares, isto é, possui apenas um domínio transmembranar, terminando a extremidade amina no espaço extracelular e a carboxilo no citoplasma. A porção extracelular contém dois domínios C2 semelhantes ao da região Fc dos anticorpos, e a porção intracelular contém múltiplas regiões que, uma vez ativadas, acionam vias de sinalização de proliferação celular (Wang & Wei et al., 2012).

Figura 5: Estrutura da molécula de CD19. Retirado de Creative Biolabs, 2018.



Sabe-se que o CD19 está presente quase exclusivamente em células B saudáveis e neoplásicas, sendo ainda expresso em células dendríticas. Esta glicoproteína pode ser encontrada maioritariamente na membrana celular, estando presente em todas as fases de desenvolvimento a partir da célula pró-B, e só deixa de ser expressa aquando a diferenciação em plasmócito (Del Nagro et al., 2005; Tizard, 2013a). A expressão de CD19 é 3 vezes superior em linfócitos maduros relativamente às células imaturas e está normal a elevada em 88% dos linfomas B humanos (Wang & Wei et al., 2012).

Figura 6: Tipo de neoplasia consoante a célula que a originou. Retirado de American Association for Cancer Research, 2011.



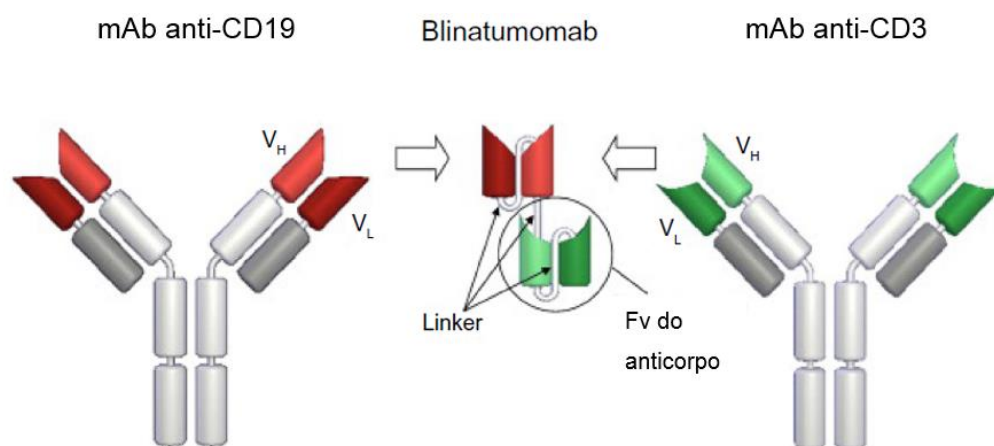
O CD19 encontra-se em aglomerados proteicos conjuntamente com o CD21, o CD81 e o CD225, sendo o agente dominante da sinalização destes complexos, que funcionam como corretores do BCR (Del Nagro et al., 2005).

A função do CD19 é promover a maturação celular e diminuir o limiar de sensibilidade das vias de sinalização das células B, facilitando a estimulação celular por vias dependentes e independentes do BCR (Chung et al., 2012; Wang & Wei et al., 2012). Em humanos foi proposto um modelo de *feedback* positivo entre o CD19 e o c-Myc, que é um proto-oncogene comumente sobreexpresso em linfoma agressivo de células B: a expressão de c-Myc leva à produção e ativação de moléculas de CD19, o que por sua vez estimula o desenvolvimento celular e mantém níveis elevados da proteína c-Myc. Constatou-se ainda que apesar de a expressão de CD19 não ser necessária para o aparecimento da doença, a sua sobreexpressão está relacionada com apresentações agressivas de linfoma em humanos e murganhos, havendo um aumento de 42% no tempo de sobrevivência quando as células neoplásicas não expressam CD19 (Chung et al., 2012; Poe, Minard-Colin, Kountikov, Haas & Tedder, 2012). Quando se liga um anticorpo, o CD19 internaliza rapidamente (Hansen et al., 1996), quebrando-se o *feedback* positivo do CD19 com o c-Myc (Chung et al., 2012).

### 3.3.2.1. Imunoterapia direcionada ao CD19 humano

Já foram postos em prática vários ensaios clínicos em humanos com anticorpos anti-CD19, nos quais se obteve resultados promissores. Nalguns desses ensaios foram administrados anticorpos não conjugados, noutros conjugou-se substâncias químicas tóxicas, como a ricina ou derivados da maitansina (Blanc et al., 2011). Também foi desenvolvida uma imunoglobulina biespecífica constituída apenas por duas regiões variáveis e que tem como alvos o CD19 e o CD3 (Figura 7), o blinatumomab (Anderson & Modiano, 2015).

Figura 7: Composição do blinatumomab. Retirado de Nagorsen, Kufera, Baeuerle & Bargoub, 2012.



O CD19 também tem sido estudado como alvo de terapia com CAR-T em LNH, havendo interesse na sua utilização quando as células neoplásicas não expressam CD20 ou se tornam resistentes ao rituximab, por exemplo (Allegra et al., 2016; Davila & Sadelain, 2016). Ainda não há dados publicados relativos à terapia com mAb e CAR-T anti-CD19 no linfoma canino.

### 3.3.3. CD21

O CD21 é uma glicoproteína transmembranar de tipo I de 145 kDa, sendo constituída por um domínio citoplasmático de reduzidas dimensões e por uma grande porção extracelular que é composta por 15 a 16 repetições de domínios iguais (Frémeaux-Bacchi et al., 1996).

Este recetor é quase exclusivo de linfócitos B, existindo também numa subpopulação de linfócitos T periféricos, em timócitos e células dendríticas foliculares (Frémeaux-Bacchi et al., 1996; Faldyna et al., 2007). A sua expressão é abundante em linfócitos B maduros dos tecidos linfóides, mas as células B do sangue periférico e da medula óssea têm uma expressão baixa de CD21 (Clark & Ledbetter 1989). Esta proteína é um marcador de maturação e deixa de ser expressa após a ativação da célula, pelo que os linfócitos B  $CD20^+CD21^-$  são mais diferenciados que os  $CD20^+CD21^+$ . A expressão de CD21 só ocorre em metade dos linfomas de células B humanos (Clark & Ledbetter 1989), mas no linfoma canino o cenário é diferente (Seelig et al., 2016). Cerca de 92% a 97% dos linfomas caninos de células B expressam CD21, apesar de não se ter definido quão forte é essa expressão (Wilkerson et al., 2005; Rao et al., 2011; Thalheim, Williams, Borst, Fogle & Suter, 2013).

Em pacientes humanos com DLBCL a expressão de CD21 foi associada a uma maior sobrevida, e em ratinhos inoculados com células de linfoma a morbilidade e mortalidade foram bastante inferiores quando os tumores expressaram CD21 (Otsuka et al. 2004). No entanto, no linfoma canino a expressão de CD21 parece não ter valor prognóstico (Rao et al., 2011). Sabe-se que a expressão de CD21 está negativamente correlacionada com a internalização dos anticorpos anti-CD19, isto é, em células sem CD21 a internalização do CD19 é rápida e

o efeito citotóxico dos ADC ocorre, mas o mesmo não se verifica em células com forte expressão de CD21 (Ingle et al., 2008).

Os principais ligandos do CD21 são os fragmentos da molécula C3 do complemento, principalmente o C3d. Tal como já foi explicado anteriormente, o CD21 é um componente do correceptor do BCR e a sua estimulação com antígeno opsonizado por C3d leva ao aumento da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma, facilitando a ativação dos linfócitos B. Outros ligandos conhecidos do CD21 são o interferão- $\alpha$  e o CD23 (Frémeaux-Bacchi, 1996; Tizard, 2013a).

Em humanos existe uma forma solúvel de CD21 que preserva a capacidade de ligação do CD21 membranar, circulando no sangue em complexos com o C3 do complemento e com uma forma solúvel do CD23. Julga-se que a função do CD21 solúvel é inibir a produção de IgE induzida pelo CD23 solúvel (Frémeaux-Bacchi et al., 1996).

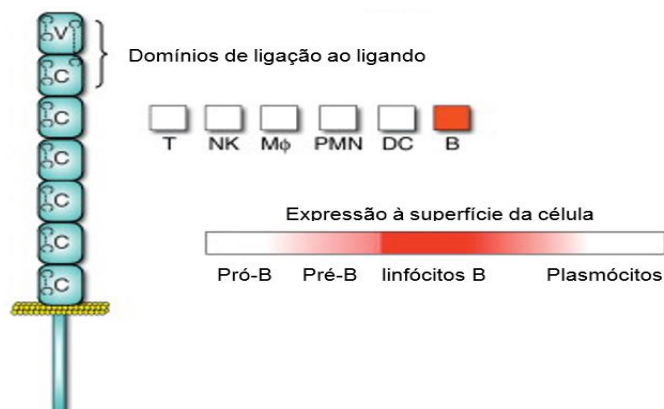
Sabe-se também que a ligação de anticorpos ao CD21 leva à sua internalização e pode estimular a proliferação de linfócitos B *naïfs* (Clark & Ledbetter, 1989), no entanto, a internalização de ADC anti-CD21 é muito lenta e, mesmo nas linhas celulares de linfoma B com maior expressão deste recetor, não é suficiente para produzir um efeito antitumoral eficaz (Ingle et al., 2008).

Apesar do seu potencial terapêutico com ADC estar limitado pela fraca internalização, em 1992 foi feito um ensaio clínico de fase I com um anticorpo conjugado com um radioisótopo, participando nele 18 doentes humanos com LNH recidivado/refratário ao tratamento. O ADC foi considerado seguro e atingiu-se uma taxa de resposta geral (ORR) de 72% (Czuczman et al., 1993), mas os estudos não foram prosseguidos.

#### 3.3.4. CD22

O CD22 é uma proteína transmembranar pertencente à superfamília das imunoglobulinas, contendo domínios de ligação ao ácido siálico. A forma predominante do CD22 humano contém sete domínios extracelulares de sialoadesina, e é nos domínios 1 e 2 que o seu ligando interage (Figura 8). A porção intracelular é fosforilada quando se dão ligações cruzadas de antígeno-anticorpo no BCR (Cesano & Gayko, 2003; Siegel et al., 2003).

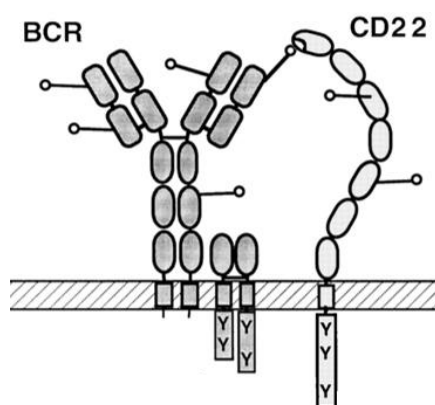
Figura 8: Constituição da molécula de CD22. Adaptado de Poe & Tedder, 2012.



Esta proteína é expressa por células linfóides do tipo B, surge tardiamente nas células pró-B e deixa de ser expressa na diferenciação para plasmócito (Cesano & Gayko, 2003; Faldyna et al., 2007). Sabe-se que o CD22 está presente em quase todos os linfócitos B saudáveis e o número de moléculas ronda os  $2 \times 10^4$  por célula (Cesano & Gayko, 2003). A expressão de CD22 ocorre em 60% a 85% das neoplasias de células B em humanos (Siegel et al., 2003; Seelig et al., 2016) e no DLBCL canino também (Seelig et al., 2016), mas a sobreexpressão de CD19 e de c-Myc diminui a expressão de CD22 (Chung et al., 2012).

Pensa-se que o CD22 desempenha duas funções bastante diferentes. A primeira função é direcionar os linfócitos periféricos para a medula óssea através de ligandos do endotélio vascular, graças às propriedades adesivas do CD22 e da alta especificidade para o ácido siálico (Kelm, Gerlach, Brossmer, Danze & Nitschke, 2002; Cesano & Gayko, 2003). A segunda função é antagonizar a ativação celular induzida pelo BCR: a estimulação do BCR leva à ativação do CD22, que por sua vez recruta a tirosina-fosfatase, uma enzima antagonista das vias de sinalização do BCR (Kelm & Gerlach et al., 2002).

Figura 9: Ligação e antagonismo do CD22 ao BCR. Retirado de Kel & Gerlach et al., 2002.



Uma particularidade do CD22 é a sua capacidade para internalizar rapidamente, após a interação com o ligando ou um anticorpo, sendo posteriormente degradado no citoplasma (Shan & Press, 1995), característica esta que é bastante desejável na terapia com ADC (Berguig et al., 2015).

#### **3.3.4.1. Imunoterapia direcionada ao CD22 humano**

Para humanos desenvolveu-se um anticorpo humanizado anti-CD22, o epratuzumab, que foi testado em ensaios clínicos de fase I/II em linfoma B indolente e recidivado. De 55 doentes apenas 9 entraram em remissão, mas nestes casos a remissão durou, em média, 20 meses. A toxicidade foi considerada aceitável, havendo apenas linfopenia transitória (Leonard et al., 2003).

Os anticorpos monoclonais com alvos diferentes podem exercer o seu efeito por mecanismos distintos, pelo que se testou a administração combinada de epratuzumab e rituximab em LNH

indolente, sendo que a percentagem de remissões completas obtida foi 3 a 4 vezes superior à do uso exclusivo de rituximab. Também foram desenvolvidos e testados ADC anti-CD22 para pacientes humanos, produzindo efeitos antitumorais com algum sucesso (Cesano & Gayko, 2003).

### **3.3.5. CD74**

O CD74 pertence ao grupo das glicoproteínas transmembranares de tipo II, pelo que só atravessa a membrana celular uma vez, e tem duas cadeias de glúcidos acopladas ao terminal amina, no domínio extracelular (Stein et al., 2007).

Este recetor é encontrado genericamente em células que expressam MHC de classe II, como os linfócitos B, alguns subtipos de linfócitos T ativados e epitélio do timo, os monócitos, os macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno, podendo ainda ser expresso em células endoteliais e epiteliais quando há inflamação no local (Stein et al., 2007; Tizard, 2013a). Segundo Stein e colaboradores (2004), o CD74 é expresso em 90% das neoplasias humanas de células B, mas também em neoplasias gástricas, renais, pulmonares e tímicas, parecendo haver uma relação de mau prognóstico com a maior expressão de CD74.

Para além de ser *chaperone* do MHC de classe II, o CD74 desempenha funções como molécula acessória de diversas vias de sinalização, e está envolvido na maturação e sobrevivência de macrófagos e de células B, através da ativação de genes antiapoptóticos e produção de fatores de transcrição, como o fator nuclear kb (Stein et al., 2007; Su, Na, Zhang & Zhao, 2017). O CD74 também é um recetor de alta afinidade do fator inibidor da migração de macrófagos, uma citocina que contribui para a ativação de monócitos e macrófagos (Stein et al., 2007).

Hansen e colaboradores (1996) estudaram um anticorpo monoclonal murino anti-CD79 humano, testando-o em linhas celulares de linfoma não-Hodgkin. A ligação deste anticorpo ao CD79 revelou a capacidade de internalizar a uma velocidade superior à de recetores considerados bons internalizadores, como o CD19 e o CD22. A internalização do CD74, sendo diferente do CD22, não depende de ligação cruzada com os anticorpos, e a sua expressão não sofre regulação negativa: as moléculas internalizam para lisossomas e são formados novos CD74 para as substituir, apesar de a um ritmo inferior ao da internalização.

#### **3.3.5.1. Imunoterapia direcionada ao CD74 humano**

De acordo com características do CD74, a imunoterapia anti-CD74 mais indicada para linfoma incluirá a administração de ADC. Recorrendo a murinhos com imunodeficiência combinada grave (SCID) transplantados com células Raji e Daudi, Stein e colaboradores (2007) testaram a eficácia e a toxicidade de anticorpos conjugados com diferentes radioisótopos, doxorubicina e outros fármacos, resultando na sobrevivência prolongada dos animais tratados e com toxicidade mínima ou inexistente.

Já foi estudada a utilização de anticorpos anti-CD74 e anti-CD20 em simultâneo para o tratamento de linfoma refratário ao tratamento, e mais uma vez se observaram resultados que atestam o efeito sinérgico da combinação de anticorpos diferentes (Christian et al., 2015).

### 3.3.6. CD80

Na ativação dos linfócitos T induzida pelas APC é necessária, para além da apresentação de antígeno pelo MHC ao TCR, a coestimulação concomitante por moléculas *immune checkpoint*. Estas moléculas têm como função regular a resposta imunitária e prevenir a ocorrência de fenómenos de autoimunidade, existindo *immune checkpoints* facilitadores e bloqueadores da resposta imunitária (Yang & Sim, 1999; Armand 2015).

Dentro deste grupo de moléculas, os corretores mais estudados no contexto da imunoterapia oncológica são o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) e a proteína de morte celular programada 1 (PD-1). Os ligandos, presentes na membrana das APC, são o CD80 e CD86 para o CTLA-4 e os ligandos 1 (PD-L1) e 2 (PD-L2) da PD-1 (Armand, 2015).

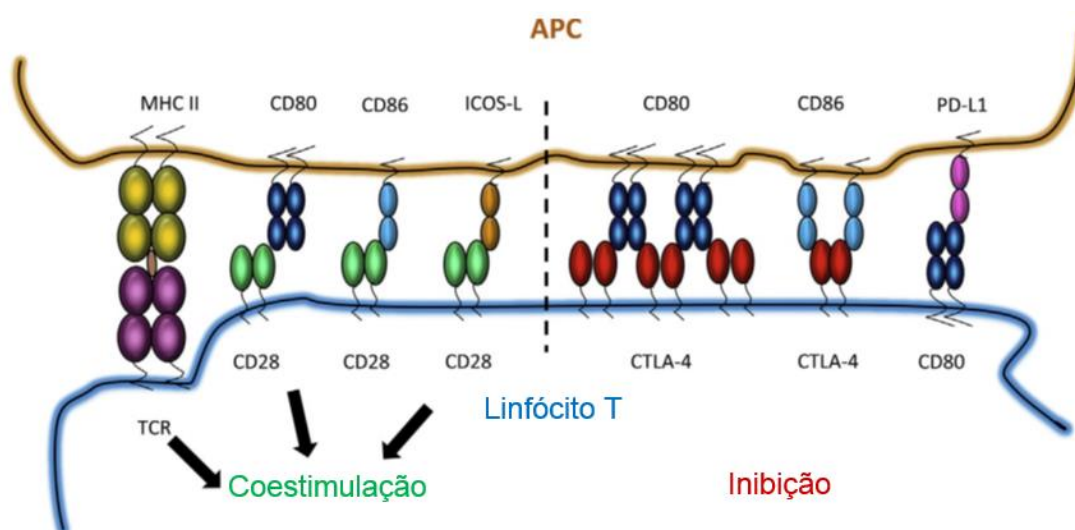
O CD80 é uma glicoproteína transmembranar de tipo 1 com 45 a 60 kDa pertencente à superfamília das imunoglobulinas (Soskic, Qureshi, Hou & Sansom, 2014), e em condições fisiológicas é expresso transientemente nos monócitos, macrófagos, células dendríticas, e linfócitos B e T ativados (Collins, Ling & Carreno, 2005; Mir, 2015).

A função primária do CD80 é a ativação de linfócitos T: a sua ligação ao CD28 dos linfócitos T *naïfs* aciona diversas vias de sinalização e contribui para a ativação e migração dos linfócitos T (Altman & Dang, 2012; Soskic et al., 2014). Contudo, a apresentação antígenica ao TCR leva ao aumento da expressão de CTLA-4 no linfócito T e promove a sua mobilização para a membrana, onde este irá competir com o CD28 pela ligação com o CD80 (Pianko, Liu, Bagchi e Lesokhin, 2017). Considera-se então que a função do CTLA-4 é regular negativamente a ativação de linfócitos T (Galanina, Kline & Bishop, 2017), tanto pelo antagonismo competitivo como pela ativação de vias de sinalização inibitórias (Soskic et al., 2014; Anderson & Mondiano, 2015).

Mais recentemente descobriu-se que nas células T o CD80 age como recetor para o PD-L1, que é um ligando frequentemente expresso em células imunitárias e nalguns tumores hematopoiéticos (Galanina et al., 2017). Esta ligação promove a proliferação de linfócitos T reguladores, mas resulta num estado de anergia nos restantes linfócitos T (Butte, Keir, Phamduy, Freeman & Sharpe, 2007; Haile, Horn & Ostrand-Rosenberg, 2014).



Figura 10: Coestimulação ou inibição condicional do linfócito T citotóxico mediadas pelo CD80. Retirado de Soskic et al., 2014.



Para além da coestimulação CD80-CD28 ser necessária para a ativação do linfócito T, a expressão de CD80 contribui para a predominância de linfócitos CD8<sup>+</sup> e facilita o reconhecimento e a citotoxicidade mediados por células *Natural Killer*. Daí se explica que a maioria das neoplasias não expresse CD80, escapando à citotoxicidade celular (Mir, 2015). Ramarathinam, Castle, Wu e Liu (1994) transfetaram uma linha celular não imunogénica de leucemia humana com o gene do CD80, inocularam estas células em murganhos imunocompetentes e verificaram que esta modificação à linha celular permitiu o desenvolvimento da imunidade adquirida contra as células neoplásicas, prevenindo a metastização para o linfonodo. Esta experiência e outras semelhantes abriram a busca por terapias combinadas com fármacos, interleucinas ou até vírus com o propósito de aumentar a expressão de CD80 em células neoplásicas (Singh et al., 2003; Mir & Agrewala, 2008). Haile e colaboradores (2014) desenvolveram uma forma solúvel de CD80 capaz de neutralizar o PD-L1 das células tumorais e, simultaneamente, providenciar a coestimulação necessária para a ativação de linfócitos T, permitindo reverter o fenómeno de anergia nos tumores que expressam PD-L1.

Apesar da tendência geral para a subexpressão de CD80 nos tumores, há algumas exceções. O linfoma de Hodgkin em humanos apresenta naturalmente uma forte expressão de CD80 (Bolognesi et al., 2000), e alguns linfomas não-Hodgkin humanos, como o linfoma folicular e DLBCL, expressam o CD80 constitutivamente (Mir & Agrewala, 2008; Hariharan et al., 2013), pelo que nestes casos a terapia dirigida contra esta glicoproteína pode representar uma estratégia promissora (Bolognesi et al., 2000; Mir & Agrewala, 2008).

A ligação cruzada dos anticorpos com o CD80 inibe a proliferação celular, estimula a produção de moléculas pró-apoptóticas e facilita a ADCC (Suvas, Singh, Shadev, Vohra & Agrewala, 2002; Hariharan et al., 2013). Hariharan e colaboradores (2013) demonstraram a eficácia de



um anticorpo quimérico anti-CD80, o galiximab, em ratinhos SCID transplantados com células Raji. Observaram ainda um efeito sinérgico ao combinar a imunoterapia com fludarabina, um quimioterápico, o que resultou no aumento do tempo de sobrevida médio em 3 vezes em comparação com o grupo de controlo não tratado com galiximab.

Estando a eficácia do galiximab limitada a neoplasias que expressem CD80, foram feitos vários ensaios clínicos com doentes humanos com linfoma folicular. Em virtude da administração exclusiva de galiximab, a ORR foi de 11%. No entanto, a terapia combinada de galiximab e rituximab apresentou resultados mais satisfatórios, atingindo ORR de 64-70% (Vinjamaram, Czuczman & Hernandez-Ilizaliturri, 2008).

A toxicidade da imunoterapia com galiximab é leve a moderada, mas afeta 60% dos pacientes, que na maioria dos casos sofrem fadiga, náuseas e cefaleias (Vinjamaram et al., 2008). O anticorpo contra o CD80 é pouco tóxico para os percursoros das APC e a imunodeficiência causada pela terapia é transitória (Bolognesi et al., 2000).

Uma abordagem terapêutica alternativa poderá passar pelo bloqueio dos *immune checkpoints*, por exemplo, com recurso a anticorpos direcionados ao CTLA-4, ao PD-L1 ou à PD-1 (Armand, 2015; Galanina et al., 2017). O bloqueio destes *immune checkpoint* terá o intuito de restabelecer a citotoxicidade celular contra as células doentes.

#### **4. Objetivos**

O linfoma de células B constitui uma das neoplasias mais frequentes no cão, e o tratamento de eleição para o linfoma de células B é a quimioterapia. Contudo, apesar dos protocolos quimioterápicos induzirem remissão na grande maioria dos casos, o tempo de sobrevida médio ronda 1 ano e a recidiva está frequentemente associada a resistências à terapia (Ito et al., 2015; Zandvliet, 2016). Há, portanto, a necessidade de desenvolver terapias alternativas às atuais. A imunoterapia constitui uma das alternativas mais promissoras, todavia é essencial que seja feita a validação de alvos terapêuticos com aplicação em medicina veterinária (Carter et al., 2004; Klingemann, 2018). Com vista nessa validação de novos alvos para imunoterapia, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a expressão de recetores no linfoma canino. Para esse fim foi quantificada a expressão génica dos recetores CD19, CD20, CD21, CD22, CD74 e CD80 pela técnica de qRT-PCR. Uma vez que o CD20 se apresentou como o alvo mais promissor na imunoterapia humana, foi ainda feita a quantificação da proteína de CD20 canino por *Western Blot*. Por fim, para complementar a análise do CD20 canino, procurou-se averiguar a existência de variabilidade génica entre animais através da sequenciação de DNA.

## **Capítulo III – Materiais e métodos**

### **1. Amostra em estudo**

Para este estudo foram selecionados 22 casos de cães com linfoma: 18 de linfoma de células B, 3 de células T e 1 não-B/não-T, diagnosticados e acompanhados no Hospital Escolar da FMV-UL. Como controlo foram incluídas 8 amostras provenientes de cães saudáveis, do biotério de experimentação da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Utrecht, Países Baixos. Também foi utilizada a linha celular CLBL-1, de DLBCL canino, (Rütgen et al., 2010; Rütgen & Willenbrock et al., 2012) como controlo positivo.

#### **1.1. Critérios de inclusão**

Aos animais suspeitos de linfoma foi feito o exame clínico, hemograma e análises bioquímicas, exames imagiológicos e citologia de linfonodos periféricos. No Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UL fez-se a análise histopatológica aos linfonodos, abrangendo o exame morfológico, a avaliação do índice mitótico e a análise imunohistoquímica com os anticorpos CD3 (DAKO), CD79 $\alpha$ cy (clone HM57, DAKO) e PAX-5 (clone 1EW, Novocastra). A finalidade destes testes foi o diagnóstico e estadiamento do linfoma segundo o sistema de classificação da OMS. Todas amostras foram recolhidas antes de se iniciar os tratamentos.

Os animais do grupo de controlo integraram um estudo relacionado com uma técnica cirúrgica, estando inseridos num ambiente altamente controlado e livre de agentes infecciosos.

#### **1.2. Critérios de exclusão**

A exclusão de animais neste estudo foi baseada em fatores que pudessem alterar os parâmetros que se pretende avaliar. Por essa razão foram excluídos os animais com outras doenças concomitantes para além do linfoma. Para evitar a alteração da constituição tumoral, também se excluíram animais a quem se administraram fármacos antineoplásicos ou anti-inflamatórios nas 4 semanas anteriores à colheita das amostras.

### **2. Colheita das amostras**

O material biológico para este estudo foi o linfonodo pré-escapular, recolhido por biópsia excisional asséptica, de cada um dos 22 animais doentes e dos 8 animais saudáveis.

A linha celular CLBL-1 foi gentilmente cedida pela Doutora Barbara Rütgen, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Viena, Áustria (Rütgen et al., 2010; Rütgen & Willenbrock et al., 2012).

### 3. Processamento das amostras

Todos os passos do processamento dos linfonodos foram realizados em condições de assépsia e com os cuidados necessários para evitar a contaminação entre amostras.

As células CLBL-1 foram mantidas no meio Roswell Park Memorial Institute – 1640 (Lonza) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), penicilina e estreptomicina (Gibco). As células foram mantidas em estufa húmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, e manipuladas em condições de assépsia.

#### 3.1. Armazenamento das amostras

Processou-se cada linfonodo cortando-o em vários fragmentos, sendo estes conservados individualmente em *RNAlater* (Thermo Fisher Scientific) a -80°C.

### 4. Técnicas de PCR

#### 4.1. Extração de RNA dos linfonodos

A extração foi feita com o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen GmbH; Hilden, Alemanha). Começou-se por cortar um fragmento de aproximadamente 25 mg de cada linfonodo para um *eppendorf*, ao qual se adicionou 600 µL de *Buffer RLT Plus* e uma esfera metálica esterilizada. Prosseguiu-se para uma lise do fragmento no *TissueLyser II* (Qiagen) com 4 ciclos de 30 segundos a 25 Hz. Seguiu-se a centrifugação do lisado por 3 minutos à velocidade máxima, do qual se descartou o precipitado e se aproveitou o sobrenadante. Os passos seguintes foram:

1. Adicionar 600 µl de etanol a 70% ao sobrenadante;
2. Transferir 700 µl da mistura para a coluna do kit – centrifugar a  $\geq 8\,000 \times g$  durante 15 segundos e descartar o filtrado.
3. Adicionar à coluna 700 µl *Buffer RW1* – centrifugar a  $\geq 8\,000 \times g$  durante 15 segundos e descartar o filtrado;
4. Adicionar à coluna 500 µl de *RPE* – centrifugar a  $\geq 8\,000 \times g$  durante 15 segundos e descartar o filtrado;
5. Adicionar à coluna 500 µl de *RPE* – centrifugar a  $\geq 8\,000 \times g$  durante 2 minutos e descartar o filtrado;
6. Centrifugar a coluna a velocidade máxima durante 1 minuto e transferi-la para um *eppendorf*;
7. Adicionar 50 µl de água sem RNase à coluna – centrifugar a  $\geq 8\,000 \times g$  durante 1 minuto. Descartar a coluna e conservar o eluído.

#### 4.2. Tratamento com DNase

Após a extração do material genético foi feita uma degradação do DNA genômico contaminante com o *RNase-free DNase Set* (Promega) juntando-se tampão de reação da DNase 10x, DNase livre de RNase e EDTA. Aqueceu-se a solução a 37°C durante 1 hora, seguindo-se 15 minutos a 65 °C e, por fim, foi colocada em gelo.

A concentração e a pureza do RNA obtido foram determinadas por espectrofotometria através do *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific; Wilmington, Estados Unidos da América), com os comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

#### 4.3. Síntese de DNA complementar

Com as quantificações feitas, usou-se volume de cada amostra correspondente a 1 µg de RNA e sintetizou-se DNA complementar (cDNA) através do *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Alemanha). Esta etapa é constituída por duas fases. Começa-se por preparar a seguinte solução:

Tabela 2: Preparação da mistura para a ligação do *primer* à cauda de adenosinas do mRNA.

Reagente	Volume
1 µg de RNA	Variável
<i>Oligo (dT)18 primer</i> 50 µM	1 µL
Água	q.b.p. 13 µL
Total	13 µL

No termociclador (VWR) a mistura é sujeita a:

1. 65°C durante 10 minutos;
2. 4°C até ao próximo passo.

Adiciona-se uma segunda mistura ao tubo da reação:

Tabela 3: Preparação da mistura de reagentes para a retrotranscrição.

Reagente	Volume
<i>Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer</i> 5x	4 µl
<i>Deoxynucleotide Mix</i> 10 mM	2 µl
<i>Protector RNase Inhibitor</i> 40 U/µL	0,5 µl
<i>Transcriptor Reverse Transcriptase</i> 20 U/µL	0,5 µl
Total	7 µl

Deve de haver um volume final de 20 µL de solução em cada tubo de reação, e é nesta fase que ocorre a transcrição-reversa propriamente dita. Novamente no termociclador:

1. 50°C durante 30 minutos;
2. 85°C durante 5 minutos;
3. Arrefecimento para 4°C.

A integridade e pureza do RNA obtido anteriormente e do cDNA resultante foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. O gel de agarose a 1% fez-se juntando 1g de agarose em pó (PanReac AppliChem) para cada 100mL de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE), a solubilização foi feita levando a mistura à ebulição. Posteriormente foi adicionado brometo de etídio à mistura e deixou-se solidificar o gel na forma com pente para fazer poços (Bio-Rad). Para pôr em prática a eletroforese, misturou-se 2 µl da solução de cDNA, 2 µl de *Loading Dye* 6x e água filtrada q.b.p. perfazer 10 µl por cada poço do gel. Colocou-se o gel na tina (Bio-Rad) com tampão TAE, pipetou-se 5 µl de *GeneRuler 1kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) num poço e cada mistura das amostras nos restantes poços. A corrida foi mantida pela fonte de alimentação (Bio-Rad) e o gel foi revelado no *ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad). As amostras de cDNA foram conservadas a -20°C até à sua utilização.

#### **4.4. PCR quantitativa em tempo real**

Nesta técnica mede-se a incorporação de um corante fluorescente no DNA, em tempo real, durante uma série de ciclos de PCR. Quanto mais expresso estiver o gene de interesse numa amostra, mais precoce é a deteção da fluorescência, sendo menor o *threshold cycle* (Ct). O qRT-PCR foi utilizado para a quantificação relativa da expressão dos genes de CD19, CD20, CD21, CD22, CD74 e CD80 caninos.

##### **4.4.1. Escolha e desenho dos *primers* para qRT-PCR.**

Para o método utilizado é necessário quantificar, paralelamente ao gene em estudo, um gene constitutivo que permita padronizar as amostras. Previamente a este trabalho foram estudados vários genes constitutivos, e o escolhido foi o da proteína ribossomal L27 (RPL27), pela consistência dos seus resultados e características da reação. O *primer* do gene do RPL27 foi gentilmente cedido pela Professora Doutora Luísa Mateus (FMV-UL), e os restantes *primers* (Tabela 4) foram desenhados, no âmbito do projeto do linfoma canino, no *Primer Express® Software* (Applied Biosystems, Estados Unidos da América) e produzidos pela empresa Metabion (Frlabo, Portugal).

Tabela 4: Sequência dos primers desenhados para qRT-PCR. Também estão indicados os comprimentos e temperaturas de dissociação previstos dos produtos de reação.

Gene	Primer 5'-3'	Primer 3'-5'	Comprimento do produto	Td
CD19	AGGAGGAAGAGAAAGCGAATGA	GAGCACGTTGCCGTACTGATT	99	84
CD20	TGTCTATGCGCCCATCTGTATAA	TTTTCCTTTGACCAAACCTCTTCCT	124	79
CD21	AGAGCCAGTGCCAGGATGAT	CCTGCAGAAAAGACCACTAAGAAGAG	97	82
CD22	GCTCCTTGAATACTTGGCCTTCT	ATCCAGACGCAGGCCTTTT	93	81
CD74	ACCTGAAACACCTTAAGAACACCAT	CATTTCAAACAGGAGCCACTGA	86	78
CD80	CTGGAAGATGTCCCCTATAAACA	TCCTGGCCATCTGAGGAAAT	121	78
RPL27	TCGTCAACAAGGATGTCTTCAGAG	TCTTGCCAGTCTGTACCTCTCCT	96	83

Para se validar os *primers* desenhados, avaliou-se os produtos da reação de qRT-PCR, comparando-se a sua dimensão e a temperatura de dissociação (Td) observadas com as esperadas. Também se sequenciou os produtos da reação pelo método de Sanger na *GATC Biotech* (Colônia, Alemanha).

#### 4.4.2. PCR quantitativa em tempo real


Foi preparada para cada gene uma solução contendo os respectivos *primers*, água filtrada por Mili-Q (Millipore), *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) (Tabela 5).

Tabela 5: Mistura de reagentes para a reação de qRT-PCR.

Reagente	Volume
Água	4 µl
<i>Power SYBR Green PCR Master Mix</i>	10 µl
<i>primer 5'-3'</i> 1 nM	2 µl
<i>primer 3'-5'</i> 1 nM	2 µl
Total	18 µl

Numa placa de 96 poços para PCR quantitativa (BIOplastics, Landgraaf, Holanda) foram distribuídos, por cada poço, 18 µL da mistura de reagentes e, com exceção dos controlos negativos, 2 µL do cDNA anteriormente sintetizado, diluído 10 vezes. A avaliação das amostras e dos controlos negativos foi feita em duplicado.

A regulação dos ciclos térmicos e a medição da fluorescência emitida pelo corante foram feitas pelo aparelho *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), e o esquema de amplificação utilizado foi o seguinte:

1. 95°C durante 10 minutos
  2. 95°C durante 15 segundos
  3. 60°C durante 1 minuto
- 
- 40 ciclos

No final o aparelho determinou a temperatura de dissociação dos produtos de PCR, o que permitiu aferir a especificidade da amplificação. Os resultados foram avaliados com recurso ao *StepOne Software v2.3* (Thermo Fisher Scientific), e posteriormente exportados para *Microsoft Excel 2016*.

O aparelho mede a fluorescência emitida pelo *SYBR Green* ligado a DNA de cadeia dupla. Quanto mais DNA houver na amostra, mais cedo se deteta a sua presença, determinando-se o *threshold cycle*. Do modo como a experiência foi desenhada, a quantificação relativa de cDNA é um modo indireto de avaliar a expressão de mRNA. Explica-se assim que quanto menor o Ct, maior a expressão do gene em estudo.

Nesta experiência não se fez uma quantificação absoluta, mas sim uma quantificação relativa. Os dados foram processados por  $\Delta\Delta Ct$ , cujo primeiro passo foi uma padronização para cada animal da expressão de um gene usando como referência o seu RPL27, este valor é o  $\Delta Ct$ . De seguida comparou-se os  $\Delta Ct$  dos animais doentes com a média dos  $\Delta Ct$  dos animais controlo: esta comparação deu-nos o  $\Delta\Delta Ct$ . A última etapa, explicada em seguida, consistiu em converter o  $\Delta\Delta Ct$  em valores que se consigam facilmente interpretar.

Parte-se do pressuposto que a cada ciclo no termociclador, cada cadeia de DNA irá ou não originar outra igual, consoante a eficiência da reação. Em termos matemáticos, de um ciclo para o ciclo seguinte o número de cadeias de DNA será um múltiplo de  $1 + \text{Eficiência da reação}$ , podendo a eficiência variar entre 0 e 1. Para esta experiência foi pressuposta a eficiência máxima, o que implica que a cada ciclo a quantidade de DNA duplique, representado aqui:  $\text{Quantidade inicial de cDNA} \times (1 + 1)$ .

Para se estimar a quantidade de DNA resultante ao final de  $n$  ciclos pode utilizar-se a expressão:  $\text{Quantidade inicial de cDNA} \times 2^n$  (Livak & Schmittgen, 2001).

Aplicando este fundamento teórico, mas tendo em vista a quantificação relativa de um grupo sobre o outro, transformou-se o valor anteriormente obtido utilizando a seguinte expressão:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Esta transformação indica-nos quantas vezes maior ou menor é a expressão de um gene no grupo dos doentes relativamente ao grupo dos saudáveis.

#### 4.5. PCR convencional

Para a sequenciação de genes na empresa *GATC Biotech* é solicitado um mínimo de 100 ng de DNA concentrado em 5 µl, pelo que foi necessário proceder-se à amplificação do gene CD20 canino a partir do cDNA sintetizado.

##### 4.5.1. Desenho dos *primers* para PCR convencional

Para esta técnica foram desenhados *primers* (Tabela 6), que foram produzidos pela empresa Metabion (Frilabo).

Tabela 6: Sequência dos *primers* desenhados para PCR convencional.

Gene	Orientação	Sequência
CD20	Primer 5'-3'	GGGCCCAGGCGGCCATGACAACACCCAGAAATTCA
	Primer 3'-5'	CCTGGCCGGCCTGGCCAGGGATGCTGTCGTTTTCTATT

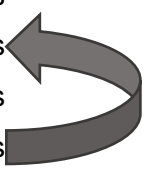
##### 4.5.2. Reação em cadeia da polimerase

Para a reação de PCR, foi utilizada a *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* e os reagentes indicados na Tabela 7. Para cada reação foi utilizado controlo negativo sem DNA e controlo positivo com cDNA da linha celular CLBL-1.

Tabela 7: Mistura de reagentes para PCR convencional.

Reagente	Volume
Buffer HF 5X	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,5 µl
dNTPs (NZYTech)	0,5 µl
Primer 5'-3' 1 nM	0,75 µl
Primer 3'-5' 1 nM	0,75 µl
Polimerase <i>Phusion</i> 2 U/µL	0,1 µl
cDNA 100-400 ng	Variável
Água	q.b.p. 25 µl
Total	25 µl

Em seguida está representado o esquema de amplificação utilizado para PCR convencional:

1. 98°C durante 30 segundos
  2. 98°C durante 10 segundos
  3. 56°C durante 30 segundos
  4. 72°C durante 60 segundos
  5. 72°C durante 10 minutos
- 

No final de cada PCR fez-se uma eletroforese em agarose a 1%, usando as mesmas condições anteriormente descritas, para verificar a eficácia da reação.



#### 4.5.3. Purificação de DNA

Depois de várias reações de PCR, juntou-se todo o volume das reações de cada amostra e procedeu-se à sua purificação. Para tal, fez-se eletroforese em gel de *Agarose ultrapure grade* (NZYTech) a 2%. Terminado esse passo, confirmou-se a presença e integridade das bandas de DNA no ChemiDoc. O passo seguinte foi cortar cada banda no *UV GenoView Smart* (VWR) e purificar o DNA com o kit NZYGelpure (NZYTech):

1. Transferir cada banda de gel com DNA para um *ependorf* e pesá-lo;
2. Adicionar ao *ependorf* 500µl de *Binding Buffer* por cada 100 mg do fragmento de gel;
3. Incubar entre 55°C e 60°C durante 10 minutos, agitando ocasionalmente para facilitar a liquefação do gel;
4. Adicionar 100 µl de isopropanol por cada 100 mg de gel;
5. Carregar a mistura do *ependorf* para a coluna do kit – centrifugar a >12000 x g durante 1 minuto e descartar o filtrado. Repetir até todo o volume da mistura ter passado pela coluna;
6. Adicionar à coluna 500 µl de Wash Buffer - centrifugar a >12000 x g durante 1 minuto e descartar o filtrado.
7. Adicionar à coluna 600 µl de Wash Buffer - centrifugar a >12000 x g durante 1 minuto e descartar o filtrado.
8. Centrifugar a coluna a velocidade máxima durante 1 minuto e transferi-la para um *ependorf*
9. Adicionar 50 µl de *Elution Buffer* à coluna e incubar durante 1 minuto – centrifugar a >12000 x g durante 1 minuto. Descartar a coluna e conservar o eluído do *ependorf*.

Para a sequenciação preparou-se uma solução de 10 µl contendo 100 ng a 400 ng de DNA e um dos *primers* para o gene alvo a 2,5 µM. A solução foi enviada para a empresa *GATC Biotech*, para ser feita a sequenciação pelo método de Sanger. A análise da sequência foi feita no software Vector NTI (Thermo Fisher Scientific).

#### 5. Western Blotting

Com a finalidade de avaliar a expressão proteica das amostras do biobanco canino, fez-se eletroforese da proteína total em gel de poliacrilamida e transferiu-se para membrana de nitrocelulose. A membrana foi posteriormente incubada com anticorpos primários e secundários (Tabelas 9 e 10), tendo como alvos o CD20 canino e, servindo como controlo de *loading*, a  $\beta$ -actina canina.

### 5.1. Extração de proteína total dos linfonodos

Cortou-se um fragmento de aproximadamente 25 mg de cada linfonodo, evitando-se contaminações cruzadas. Cada fragmento foi colocado num *ependorf* de 2 ml, ao qual se adicionou uma esfera metálica esterilizada e 400 µl de tampão *radio-immunoprecipitation assay* (RIPA) (Thermo Scientific) com inibidores de proteases e de fosfatases. Os fragmentos foram transportados em gelo e macerados no *TissueLyser II* em quatro ciclos a 25 Hz durante 30 segundos. Quantificou-se a proteína no *NanoDrop* e conservou-se a mesma a -20°C.

### 5.2. Extração de proteína total de CLBL-1

Começou-se por lavar as células duas vezes em tampão fosfato salino (PBS), centrifugando a 400 x g durante 5 minutos e descartando-se o sobrenadante. O passo seguinte foi suspender o *pellet* de células em 150 µl de tampão RIPA com inibidores de proteases e de fosfatases e incubar em gelo durante 30 minutos. Findo esse tempo voltou a homogeneizar-se a solução com uma micropipeta e deixou-se a incubar mais 15 minutos. Por fim, centrifugou-se a 14000 x g durante 10 minutos a 4°C, quantificou-se a proteína no *NanoDrop* e conservou-se o sobrenadante a -20°C.

### 5.3. Preparação do gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida (National Diagnostics) é, na verdade, constituído por dois géis: o gel de concentração onde a proteína se vai concentrando até formar uma banda, e o gel de resolução, onde as proteínas são separadas consoante a sua dimensão.

Tabela 8: Reagentes necessários para 3 géis de poliacrilamida a 15%.

Reagentes	Gel de Concentração	Gel de Resolução
Água	4,29 ml	3,585 ml
Protogel	1,245 ml	7,5 ml
Tampão de concentração	1,875 ml	
Tampão de resolução		3,75 ml
APS 10%	75 µl	150 µl
TEMED (PanReac AppliChem)	7,5 µl	15 µl

A montagem do gel foi feita da seguinte forma:

1. Montou-se o *casting* de 1 mm de SDS-PAGE (*Electroforesis KuroGel Verti 10104K*, VWR® International, Carnaxide, Portugal);
2. Adicionou-se o gel de resolução ao *casting*. Juntou-se água filtrada para alinhar o gel e retirar as bolhas de ar. Deixou-se polimerizar durante 20 minutos e retirou-se a água do *casting*;
3. Juntou-se o gel de concentração ao *casting*. Colocou-se um pente formador de 10 poços. Nova polimerização durante 20 minutos.

#### **5.4. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida**

Montou-se o *casting* de eletroforese na tina de eletroforese, juntou-se o tampão de corrida e removeu-se o pente formador de poços.

Preparou-se uma mistura para cada amostra com 15 µg de proteína total, 5 µl de *Loading Buffer* a 4x e PBS q.b.p. 20 µl. Esta solução foi submetida a uma temperatura de 100°C durante 10 minutos no bloco térmico (Boekel Scientific). Às misturas aquecidas fez-se *spin down* e colocou-se em cada poço do gel. Foi utilizado o marcador molecular *NZY Colour Protein Marker II* (NZYTech Lda, Lisboa, Portugal). A eletroforese foi feita a 80 V nos primeiros 20 minutos e a 150 V até a frente de corrida chegar ao fim do gel.

#### **5.5. Transferência por eletroforese**

Banhou-se a esponja, o papel de filtro e a membrana de nitrocelulose em tampão de transferência e montou-se o *casting*. Colocou-se o *casting* na tina de eletroforese, juntamente com tampão de transferência e um bloco térmico refrigerante. A transferência fez-se a 250 mA e teve a duração de 1 hora.

#### **5.6. Incubação com anticorpos**

Lavou-se a membrana com PBS com Tween a 2% (PBS-Tween). No agitador (VWR), foi feito bloqueio com PBS-Tween com 5% de leite em pó magro (Nestlé) durante 1 hora, seguido de 3 lavagens de 10 minutos com PBS-Tween.

A incubação dos anticorpos (Tabelas 9 e 10) foi feita sob agitação numa solução de PBS-Tween 1% de leite em pó magro. Os anticorpos foram incubados durante uma hora, com 3 lavagens de 10 minutos depois do anticorpo primário e, também, depois do anticorpo secundário.

Tabela 9: Anticorpos primários utilizados.

Anticorpo primário	Descrição	Peso molecular do antígeno	Origem	Concentração
Rato anti- $\beta$ -actina	Monoclonal (IgG1)	42 kDa	Sigma-Aldrich (A5441)	1:10.000
Coelho anti-CD20 humano	Policlonal (IgG)	33 kDa	ThermoFisher (PA5-16701)	1:500

Foram comprados anticorpos secundários conjugados com peroxidase, para permitir a posterior revelação das membranas (Tabela 10).

Tabela 10: Anticorpos secundários utilizados.

Anticorpo secundário	Descrição	Origem	Concentração
Cabra anti-IgG de murganho	Policlonal (IgG)	Jackson ImmunoResearch (115-035-003)	1:7.500
Cabra anti-IgG de coelho	Policlonal (IgG)	Jackson ImmunoResearch (111-035-003)	1:10.000

### 5.7. Revelação por quimioluminescência

A revelação das membranas foi feita com Luminata Forte (Millipore) no Chemidoc, avaliando-se os resultados com o software *Image Lab* (Bio-Rad). Este último permitiu a transformação da espessura e intensidade das bandas para um valor numérico.

## 6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com a colaboração do Professor Doutor Telmo Nunes (FMV-UL), sendo a análise dos dados obtidos feita com recurso ao programa *R Commander*, e todos os testes foram feitos com um intervalo de confiança de 95%. Para os resultados de qRT-PCR, fez-se primeiro o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. Em seguida testou-se a diferenciação entre o grupo com linfoma B e o grupo controlo: para os recetores cujos valores apresentaram uma distribuição normal utilizou-se o *Welch Two Sample t-test*; naqueles em que a distribuição não foi normal utilizou-se o *Two-Sample Wilcoxon test*.

Para a comparação dos valores obtidos por qRT-PCR e WB, por se pressupor uma relação proporcional entre as variáveis, foi utilizado o teste de correlação de Pearson. Para testar a correlação entre as expressões dos CD, e para a correlação entre a expressão de CD, do tempo de sobrevida e a duração da remissão, foi aplicado o teste de correlação de Spearman.

## Capítulo IV – Resultados e discussão

### 1. Caracterização da amostra

Todas as amostras foram obtidas a partir do biobanco canino da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, desenvolvido no âmbito do Projeto do Linfoma Canino. As amostras em estudo provêm de 22 canídeos, 13 deles machos e 9 fêmeas. As idades variaram entre 3 e 17 anos, sendo a média de  $9,1 \pm 3,4$  anos. Relativamente à raça, a distribuição foi de três animais Labrador Retriever, um Schnauzer, um Rottweiler, um Basset Hound, um Pittbull, um Husky, um Boxer, um cruzado de Pointer, um Pastor Alemão, um Golden Retriever, um Beagle, um Caniche, um Doberman, um Galgo Afegão e seis animais com raça indeterminada (Anexo II).

### 2. Diagnóstico oncológico

Dos 22 animais, 18 foram diagnosticados com linfoma de células B, 3 com linfoma de células T e 1 foi diagnosticado com linfoma não-B/não-T. Foi diagnosticado linfoma folicular a 1 dos animais, sendo os restantes diagnosticados com linfoma difuso: 15 deles com linfoma de grandes células blásticas e os outros 6 com linfoma de células médias. Relativamente ao estágio da doença, 1 dos animais apresentava-se no estágio II e subestádio a, 11 apresentavam-se no estágio IV, destes 1 no subestádio a e 10 no subestádio b, os restantes 10 animais apresentavam-se no estágio V e subestádio b (Anexo II).

### 3. Caracterização do CD20

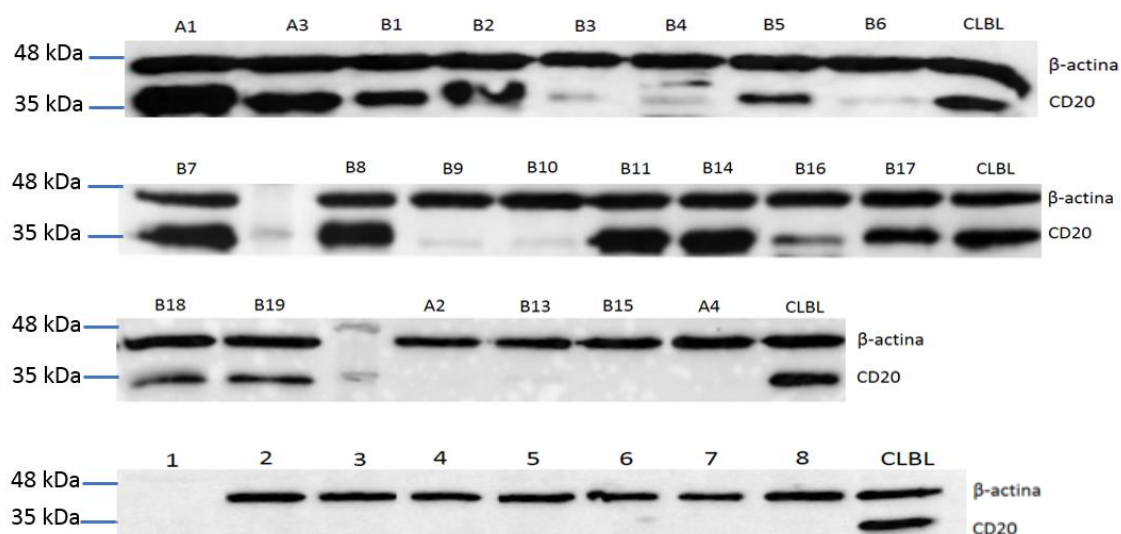
#### 3.1. Avaliação da expressão de CD20 por qRT-PCR

No fim da qRT-PCR, avaliou-se a dimensão e a temperatura de dissociação (Anexo III) e também se fez a sequenciação do produto de reação, estando confirmada a amplificação. Pela análise dos  $\Delta C_t$  determinou-se que as amostras dos animais com linfoma B têm em média  $8,22 \pm 2,23$  *folds* mais expressão de mRNA de CD20 do que o grupo controlo. A diferença entre os dois grupos foi testada com o *Welch Two Sample t-test* e considerada estatisticamente significativa ( $p=0,0072$ ). A expressão génica dos animais com linfoma T é em média  $1,3 \pm 1,2$  *folds* do grupo controlo, mas o resultado não tem valor estatístico ( $p=0,52$ ).

#### 3.2. Avaliação da expressão de CD20 por Western Blot

Pela análise da Figura 11, é possível concluir que a expressão proteica de CD20 é variável nos linfonodos de animais com Linfoma B, podendo observar-se desde bandas muito espessas a bandas quase indetetáveis. Esta observação contrasta com o que se encontra nas restantes amostras: tanto nos animais saudáveis como nos com linfoma T ou não-B/não-T, a quantidade de CD20 está abaixo de limiar de sensibilidade desta técnica. Numa das amostras dos animais saudáveis não se detetou a banda da  $\beta$ -actina, sendo por isso excluída desta análise.

Figura 11: Western Blot do extrato de proteína total de amostras do biobanco.

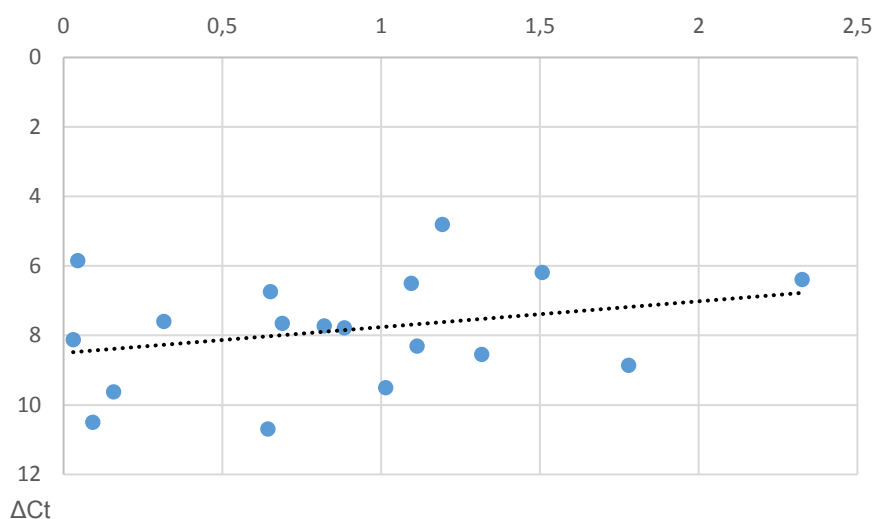


As bandas de A1 até B19 são de amostras dos animais com linfoma B; os animais A2, B13 e B15 têm linfoma T e o A4 tem linfoma não-B/não-T; os números de 1 a 8 representam os animais saudáveis do grupo de controlo. Foi usado CLBL-1 como controlo positivo em todas as membranas e a  $\beta$ -actina serviu como controlo de *loading*.

### 3.3. Comparação dos resultados de qRT-PCR e de WB

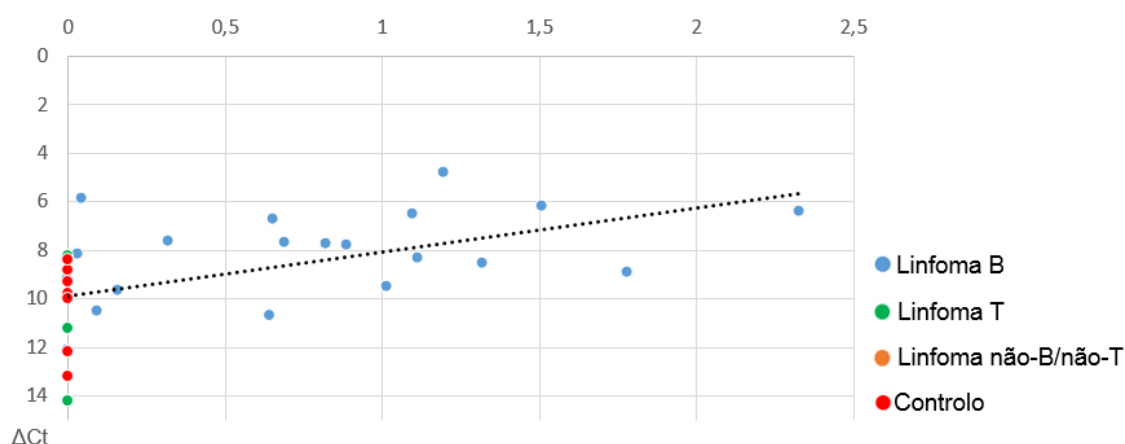
Sabendo que em média há um aumento de 8,22 vezes na expressão de mRNA de CD20 dos animais com linfoma B, comparou-se os resultados obtidos pelas duas técnicas. Utilizando a ferramenta de quantificação do *ImageLab*, a intensidade e espessura das bandas de WB foram convertidas num valor numérico. O poço com *CLBL-1*, para além de funcionar como controlo positivo, é a amostra comum a todas as membranas e permite padronizar os valores resultantes das diferentes revelações no *ChemiDoc*.

Gráfico 1: Dispersão dos resultados de qRT-PCR e de WB de linfoma B.



Apesar de haver um declive negativo da reta de regressão (Gráfico 1), não se evidencia uma correlação entre as duas variáveis ( $p=0,24$ ). Juntando as amostras do grupo controlo e as dos outros linfomas, as variáveis apresentam uma correlação de  $-0,53$  ( $p=0,003$ ). Neste caso a distribuição dos valores parece estar limitada pelo limiar de sensibilidade do *Western Blot*, o que se reflete numa acumulação de pontos no valor 0 do eixo das abcissas (Gráfico 2). Este valor de correlação assemelha-se ao coeficiente de correlação médio (0,59) obtido por Tian e colaboradores (2004) relativo à correlação entre a expressão génica e a quantidade de proteína em células de mamífero.

Gráfico 2: Dispersão dos resultados de qRT-PCR e de WB de todas as amostras.



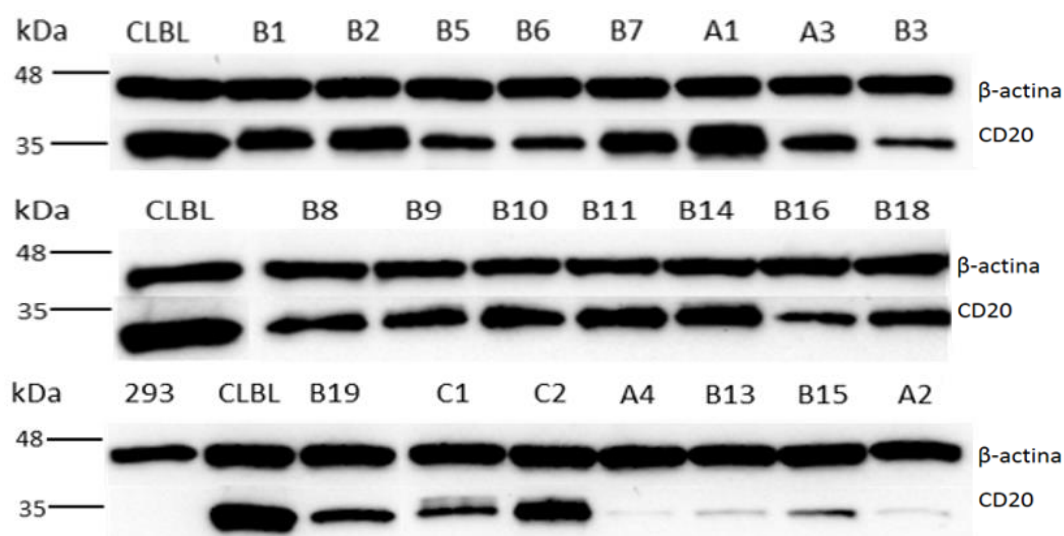
Dos resultados obtidos com a técnica de qRT-PCR é possível, até certo grau, fazer uma distinção entre os casos de linfoma B e as restantes amostras, porque todos os casos de linfoma T e do grupo controlo apresentam um valor de  $\Delta Ct$  superior a 8, o que é uma expressão relativamente baixa de mRNA. Muitas vezes não se verifica uma correlação entre a expressão de mRNA e proteína (Chen et al., 2002), e a razão dessa falta de concordância pode ser biológica, como os mecanismos de regulação pós-transcricional, ou pode advir de limitações nas técnicas aplicadas para as quantificações (Tian et al., 2004). Neste trabalho, um dos obstáculos técnicos pode ter sido a extração de material, pois foram utilizados fragmentos diferentes do mesmo linfonodo para as duas técnicas, o que pode resultar na avaliação de populações celulares diferentes. Há ainda particularidades que baixam a sensibilidade do WB, como a presença de bolhas de ar durante a transferência para a membrana ou na revelação, e a utilização de extrato proteico total, uma vez que as proteínas membranares representam apenas uma pequena fração deste. Em contraste, a técnica de qRT-PCR permite detetar quantidades ínfimas de DNA, detetando até o CD20 expresso por populações minoritárias de linfócitos B saudáveis, no caso das amostras de linfoma T. As diferenças entre as técnicas aqui utilizadas podem ser a causa da não-correlação dos resultados. Tian e colaboradores (2004) demonstraram que, apesar de uma parte das discrepâncias na expressão de mRNA e de proteína serem explicadas pelas características das diferentes técnicas de medição, a principal causa destas discordâncias é biológica.

### 3.4. Comparação dos resultados de qRT-PCR com o WB de Freire (2018)

No âmbito do projeto de investigação do linfoma canino, na FMV, há várias abordagens de análise da doença. Foi realizada uma outra avaliação da expressão de CD20 por Western Blot nos mesmos animais, 16 deles com linfoma B, 3 com linfoma T e 1 com linfoma não-B/não-T, estando os resultados incluídos na dissertação de mestrado de Freire (2018).

Freire (2018) utilizou, do biobanco canino, células linfóides derivadas dos mesmos linfonodos aqui utilizados, mas isoladas e concentradas pelo método de *Ficoll*. Partindo dessas células realizou *Western Blotting* com o mesmo protocolo apresentado nesta dissertação (Figura 12).

Figura 12: Western Blot do extrato de proteína total de amostras do biobanco (Freire, 2018).

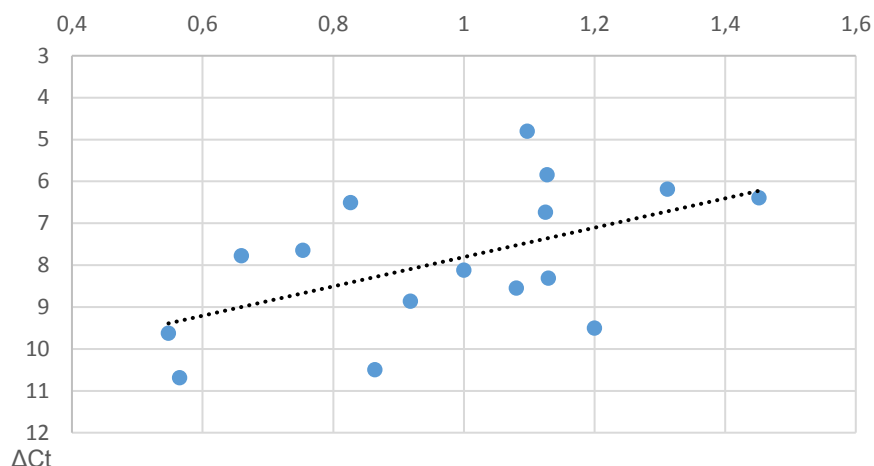


As bandas de A1 até B19 são de amostras dos animais com linfoma B, os animais A2, B13 e B15 têm linfoma T e o A4 tem linfoma não-B/não-T. Foi usado CLBL-1 como controlo positivo em todas as membranas, a linha HEK 293 como controlo negativo, e a  $\beta$ -actina serviu como controlo de *loading*. C1 e C2 são amostras colhidas na necrópsia de animais sem linfoma.

As amostras biológicas utilizadas para os WB (Figuras 11 e 12) são diferentes: neste trabalho a amostra foi o tecido do linfonodo, no de Freire (2018) a amostra é a população linfóide isolada do mesmo linfonodo. Apesar dessa diferença, os resultados assemelham-se, havendo uma correlação de 0,69 ( $p=0,0009$ ). Há, no entanto, algumas diferenças notáveis entre os dois grupos de resultados de WB. Os resultados de Freire (2018) apresentam menor variabilidade entre amostras, o que se traduz em bandas fortes de CD20 em todas as amostras de linfoma B, bandas menos fortes nas amostras de animais saudáveis e bandas fracas nas amostras de linfoma T. A expressão de CD20 nas amostras de animais saudáveis, dos animais com linfoma T e não-B/não-T provirá, provavelmente, de linfócitos B saudáveis, apesar de estar descrita a sua expressão aberrante em linfoma T (Cragg et al., 2005). Ao contrário dos resultados do WB deste trabalho, os de Freire (2018) apresentam uma correlação de -0,534 com a expressão de mRNA no linfonodo com linfoma B ( $p=0,033$ ).

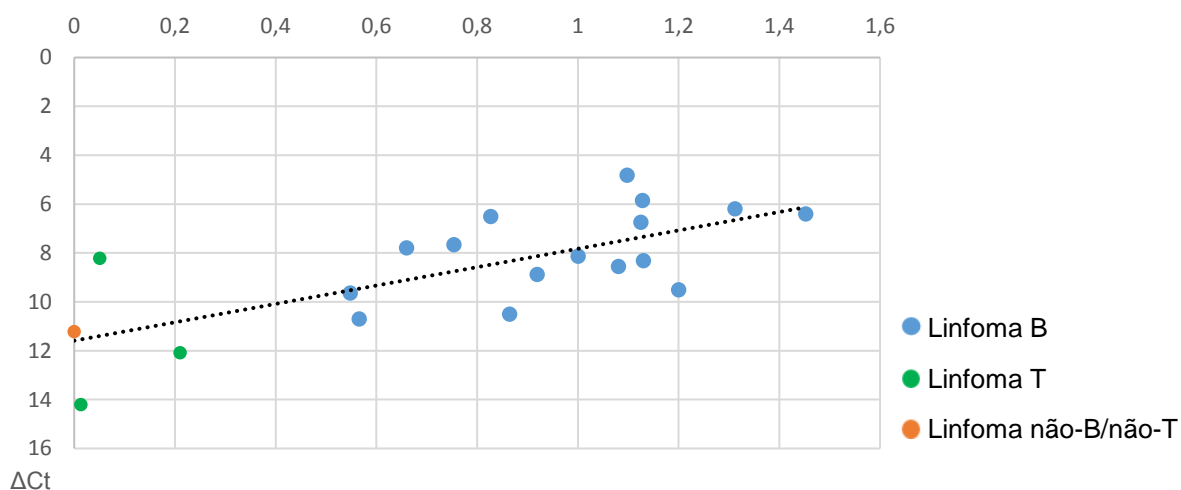


Gráfico 3: Dispersão dos valores de WB de Freire (2018) e de qRT-PCR de linfoma B.



Juntando-se os resultados das três amostras de linfoma T e o de linfoma não-B/não-T, a correlação dos resultados das duas técnicas torna-se mais sólida (Gráfico 4), sendo de -0,714 ( $p=0,0004$ ). Este coeficiente de correlação indica uma forte relação entre as variáveis, tendo em conta a bibliografia (Chen et al., 2002; Tian et al., 2004).

Gráfico 4: Dispersão dos resultados de WB de Freire (2018) e de qRT-PCR de todos os animais com linfoma.

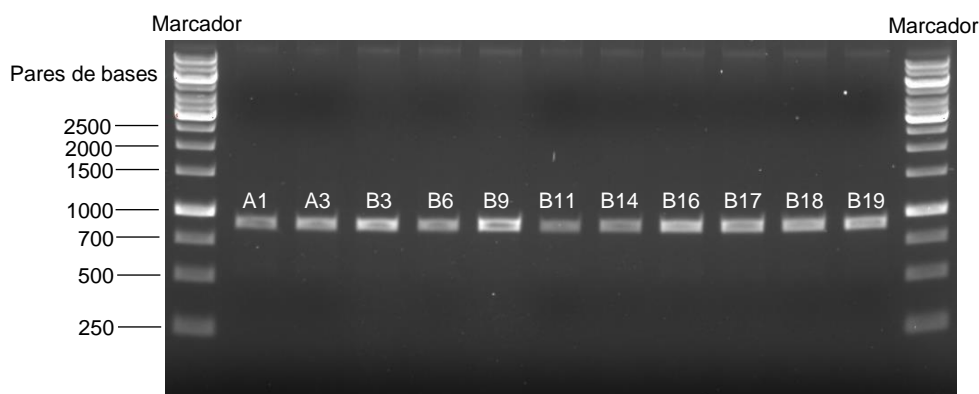


Os presentes valores de correlação poderiam não ser expectáveis uma vez que as amostras biológicas e os operadores das experiências foram diferentes, contudo, a detecção de proteína no WB de Freire (2018) assemelha-se mais à expressão de mRNA do que o WB feito neste trabalho, no sentido em que até nos linfonodos de animais com linfoma T há detecção de CD20, apesar de fraca (Figura 12). A seleção das células linfóides pelo método de Ficoll parece aumentar a sensibilidade na detecção de CD20, aproximando-a mais à sensibilidade da técnica de qRT-PCR. Tendo isto em conta, na pesquisa por recetores do linfoma canino, o método utilizado por Freire (2018) poderá ser o mais adequado para avaliar a expressão proteica por *Western Blot*.

### 3.5. Sequenciação do CD20 canino

Sabe-se que uma das causas de falha terapêutica em imunoterapia é a mutação dos alvos, alterando a conformação da proteína e a afinidade com o anticorpo (Polyak & Deans, 2002). Por essa razão amplificou-se, purificou-se (Figura 13) e sequenciou-se o gene do CD20 de todas as amostras dos animais com linfoma B e do grupo controle.

Figura 13: Gel de agarose a 2%: Bandas de CD20 canino após purificação.

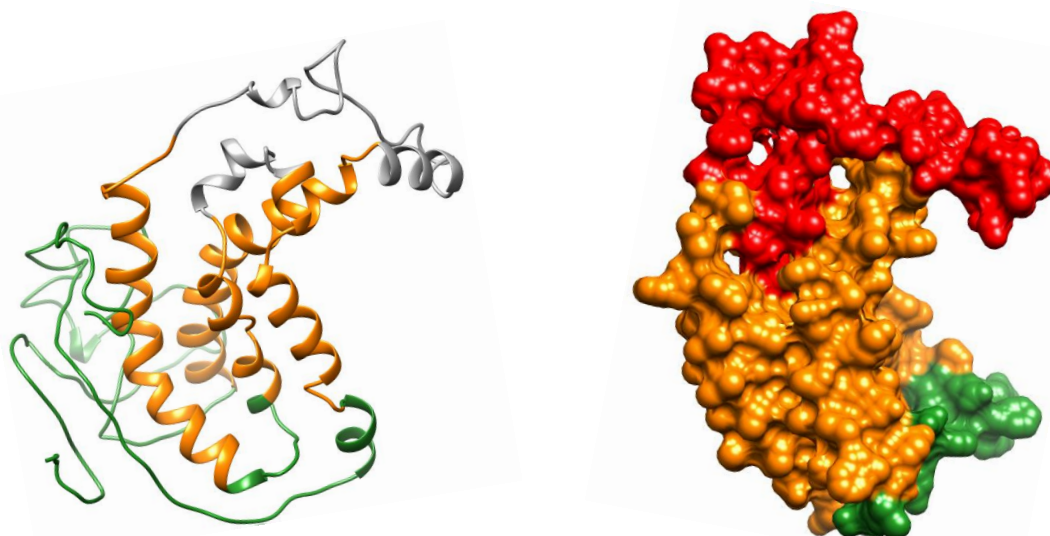


Os poços de A1 a B19 são de amostras de animais com linfoma B.

Todas as amostras apresentaram uma sequência semelhante, e foi possível a construção de um consenso dos exões do gene do CD20.

Com recurso à ferramenta *Phyre<sup>2</sup>* (Kelley, Mezulis, Yates, Wass & Sternberg, 2015) conseguiu-se ter uma ideia da estrutura terciária do CD20 canino. Conjugando essa informação com os dados provenientes da *UniProt* (Pundir, Martin & O'Donovan, 2017) e utilizando o software *Chimera 1.11.2rc* (RBVI, Universidade da Califórnia em São Francisco), foi produzido o modelo tridimensional representado na Figura 14.

Figura 14: Modelo da estrutura tridimensional do CD20 canino.



A branco e vermelho estão representados os domínios extracelulares: a grande e a pequena *loop*; a laranja estão representadas as 4 porções transmembranares; a verde são as 3 regiões citoplasmáticas.

### 3.5.1. Comparação entre sequências de CD20 canino

Foi feita uma comparação da sequência com outras anteriormente obtidas e que resultaram em patentes (Kano et al., 2005; Ito et al., 2015), e foram identificados 8 nucleótidos diferentes em relação a pelo menos uma das sequências patenteadas (Tabela 11).

Tabela 11: Diferentes nucleótidos entre as sequências de CD20 canino. Os nucleótidos que diferem das restantes sequências estão assinalados a cinzento.

Posição	Kano et al., 2005	Ito et al., 2015	Sequência obtida
320	Guanina	Adenosina	Adenosina
471	Citosina	Citosina	Timina
531	Timina	Adenosina	Timina
567	Guanina	Adenosina	Guanina
682	Citosina	Guanina	Guanina
691	Guanina	Adenosina	Adenosina
696	Citosina	Timina	Timina
908	Guanina	Adenosina	Adenosina

Traduziu-se os codogenes para visualizar a constituição da proteína. Uma vez que o código genético é redundante, as diferenças encontradas nas posições 471 e 696 não provocam alteração no resíduo da proteína. As seis diferenças encontradas nos nucleótidos que se refletiram em diferentes resíduos de aminoácidos estão indicadas na Tabela 12.

Tabela 12: Diferentes resíduos de aminoácido entre as sequências de CD20 canino. Os resíduos de aminoácidos que diferem das restantes sequências estão assinalados a cinzento.

Posição	Kano et al., 2005		Ito et al., 2015		Sequência obtida	
77	Cisteína	Polar	Tirosina	Polar	Tirosina	Polar
147	Fenilalanina	Apolar	Leucina	Apolar	Fenilalanina	Apolar
159	Metionina	Apolar	Isoleucina	Apolar	Metionina	Apolar
198	Leucina	Apolar	Valina	Apolar	Valina	Apolar
201	Alanina	Apolar	Treonina	Polar	Treonina	Polar
273	Glicina	Apolar	Glutamato	Ácido	Glutamato	Ácido

Destas seis posições assinaladas, as maiores diferenças entre resíduos encontram-se em porções transmembranares ou citoplasmáticas, e apenas os resíduos 147 e 159 se encontram na grande *loop* do CD20. A alteração no resíduo 147 é a mais relevante das duas, devido às diferenças nas cadeias laterais da fenilalanina e da leucina.

### 3.5.2. Comparação entre a sequência de CD20 humano e de CD20 canino

A homologia entre a sequência de aminoácidos do CD20 humano e da sequência por nós obtida de CD20 canino é de 82%, sendo esta semelhante à referida pela bibliografia (Kano et al., 2005; Ito et al., 2015). Fez-se a comparação entre o epítipo-alvo do rituximab no CD20 humano com a região homóloga no CD20 canino, tendo como objectivo encontrar diferenças que pudessem explicar a ineficácia deste anticorpo no linfoma B canino (Figuras 15, 16 e 17).

Figura 15: Ligação hipotética do CD20 canino (bege) com a porção variável do rituximab (verde). A ligação ao anticorpo ocorreria na grande *loop* do CD20.

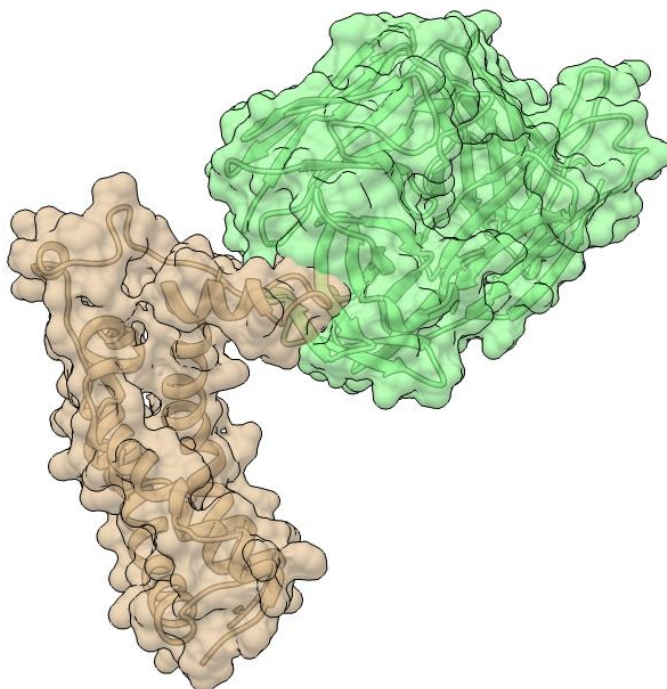
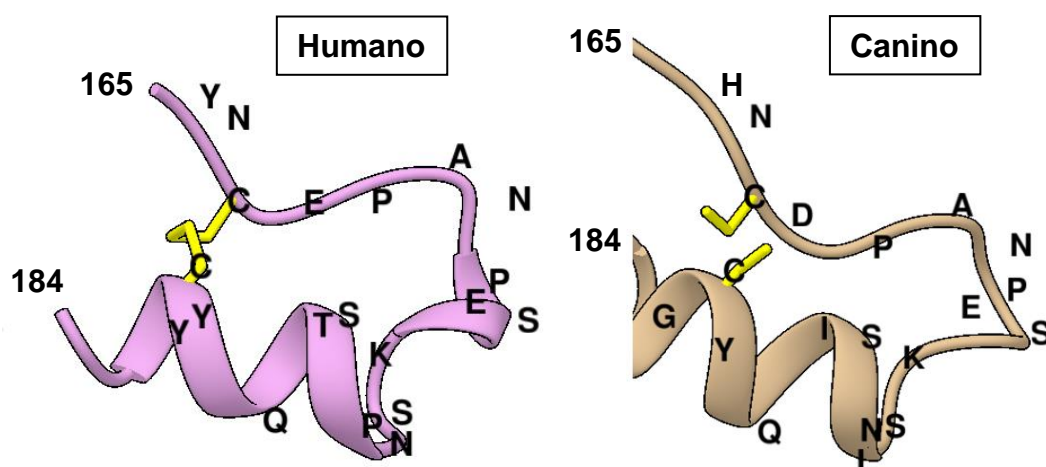


Figura 16: Pormenor do epítipo-alvo do rituximab no CD20 humano e canino. Todos os resíduos estão identificados.



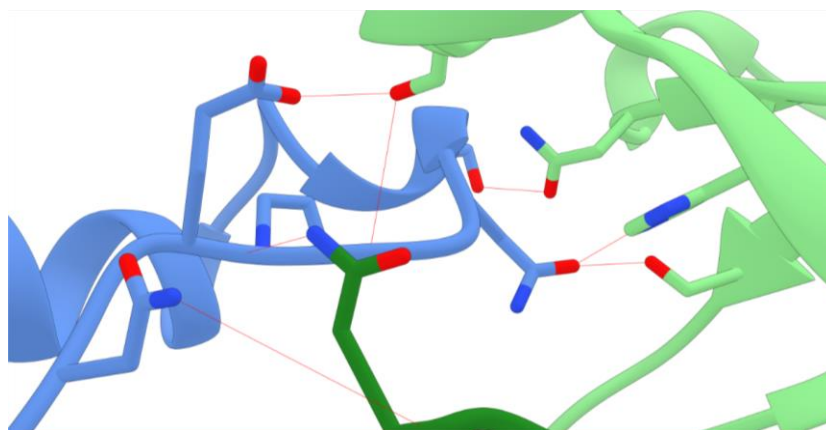
A conformação tridimensional desta porção em estudo foi estimada com 91% de confiança, e as diferenças encontradas nesta região da grande *loop* estão representadas na Tabela 13.

Tabela 13: Comparação entre CD20 humano e CD20 canino no epítopo do rituximab.

Posição	CD20 humano		CD20 canino	
165	Tirosina	Polar	Histidina	Básico
168	Glutamato	Ácido	Aspartato	Ácido
178	Prolina	Apolar	Leucina	Apolar
180	Treonina	Polar	Isoleucina	Apolar
184	Tirosina	Polar	Glicina	Apolar

Nesta pequena fração da grande *loop*, as diferenças entre as espécies não parecem ter grande importância. Segundo o modelo *in silico*, o único resíduo da Tabela 13 que interage com o anticorpo é o da posição 168, mas as propriedades do glutamato e do aspartato são semelhantes, pelo que esta alteração não justifica *per se* a perda de função do rituximab (Figura 17). Os resíduos descritos como sendo essenciais para a ligação do rituximab ao CD20 humano são a alanina 170 e a prolina 172 (Polyak & Deans, 2002), e estão ambos conservados no CD20 canino. As mutações neste epítopo são muito raras em DLBCL humano, facto que parece ser concordante com os resultados obtidos (Johnson et al., 2009).

Figura 17: Principais pontes de hidrogénio e interações não-polares entre o CD20 humano (azul) e o rituximab (verde).



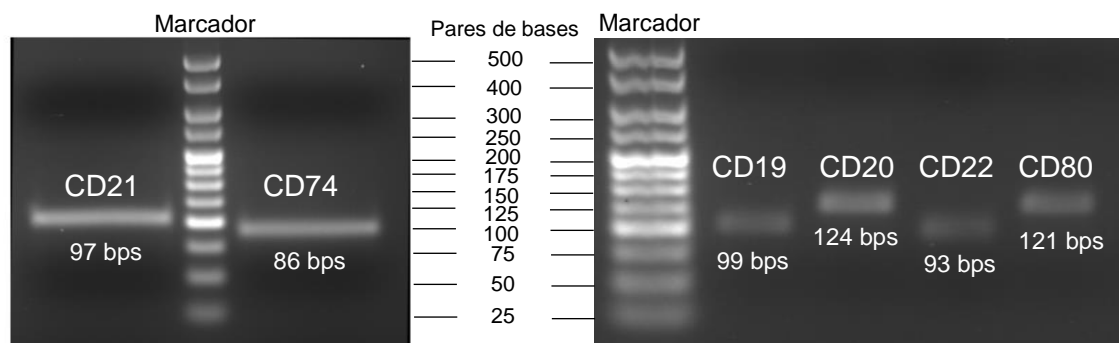
É possível, no entanto, que os 18% de resíduos não-homólogos causem alterações conformacionais ou electroestáticas da proteína, influenciando indiretamente o epítopo. Também é possível que o modelo *in silico* não represente fielmente a realidade, e que por isso não seja apropriado para esta análise. Só com base nos dados aqui apresentados, não foi possível identificar a causa para a ausência de ligação antígeno-anticorpo que leva à falha terapêutica do rituximab no linfoma B canino.

#### 4. Avaliação da expressão de outros recetores por qRT-PCR

Tendo como finalidade a validação de novos alvos para imunoterapia, para além da caracterização da expressão de CD20 canino, foi feita a quantificação relativa da expressão génica, por qRT-PCR, dos recetores CD19, CD21, CD22, CD74 e CD80 caninos.

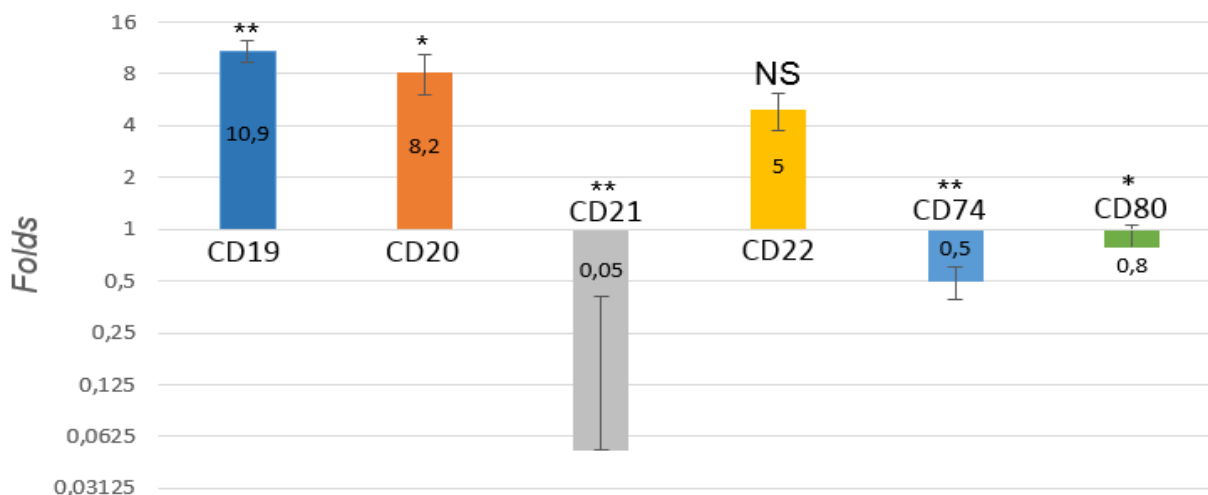
Foi avaliada a dimensão (Figura 18), a temperatura de dissociação (Anexo III) e também foi feita a sequenciação dos produtos da reação para garantir uma correta amplificação na qRT-PCR.

Figura 18: Gel de agarose a 3%: produtos da reação de qRT-PCR.



Tal como descrito anteriormente, os resultados foram tratados para representar a expressão de um gene nos animais com linfoma *versus* animais do grupo controlo, e o valor em *folds* indica quantas vezes maior ou menor é a expressão nos animais doentes. Exemplificando: um resultado de 1 significa que a expressão média é igual nos dois grupos; por sua vez, o resultado 10 significa que os animais com linfoma expressam dez vezes mais que os animais saudáveis; e o valor 0,1 representa um décimo da expressão do grupo controlo.

Gráfico 5: Quantificação da expressão dos recetores nos animais com linfoma B relativamente aos animais saudáveis.



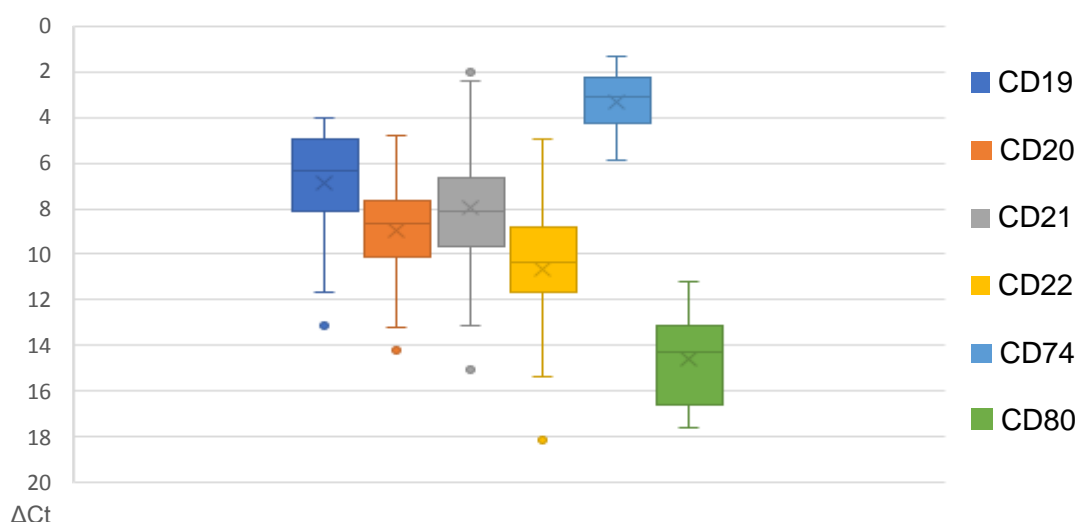
\*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; NS: Diferença não é estatisticamente significativa (Anexo IV).

Os resultados indicam que é detetado mais mRNA de CD19 e CD20 nos canídeos com linfoma do que no grupo controlo. A expressão média de CD22 também parece estar aumentada, mas a diferença entre os grupos não é estatisticamente significativa ( $p=0,196$ ) e pode ser devida ao acaso. Por outro lado, a expressão média de CD21, CD74 e CD80 parece estar diminuída nos animais com linfoma B, e representa  $\frac{1}{20}$ ,  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{4}{5}$  das expressões médias do grupo controlo, respetivamente.

#### 4.1. Comparação da expressão dos vários recetores

Para complementar a informação fornecida pelo Gráfico 5 foi feita a comparação entre os recetores (Gráfico 6). Contrastando com a análise anterior, esta avaliação utiliza valores de  $\Delta Ct$ , pelo que quanto mais próximo de 0, maior é a expressão desse gene.

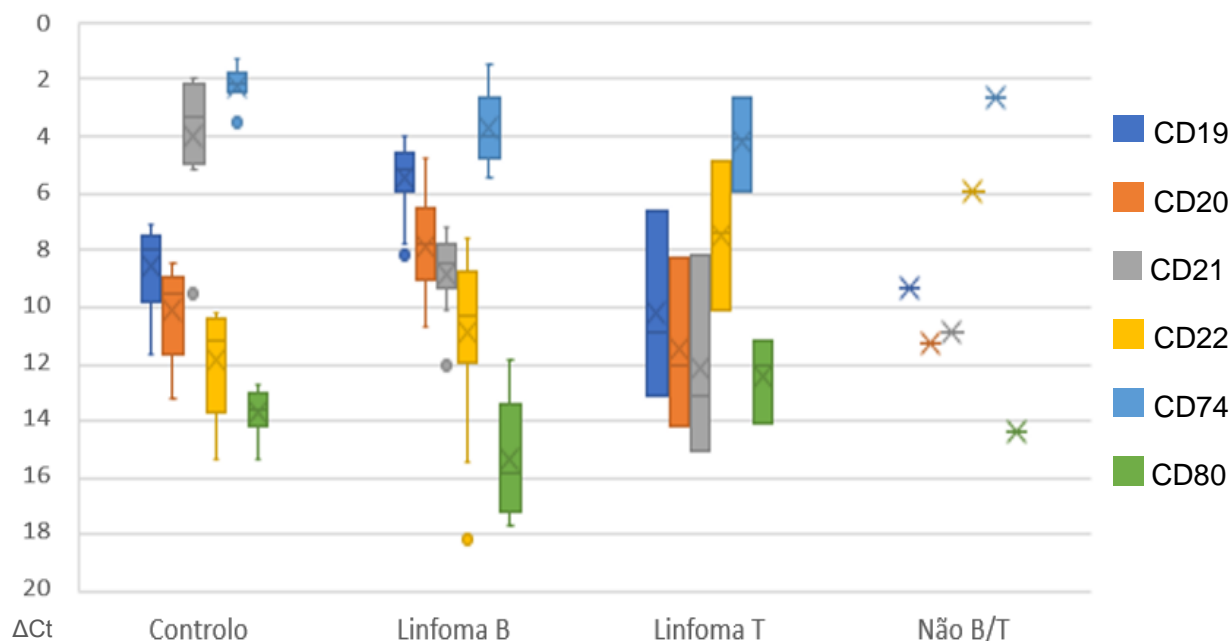
Gráfico 6: Distribuição dos valores de  $\Delta Ct$  de todos os animais.



Separando os valores por grupo é possível conceber uma visão mais geral da expressão dos recetores. Como se pode ver pelo Gráfico 7, o recetor mais expresso em linfoma B é o CD74, seguido do CD19, CD20, CD21, CD22 e, em último lugar, o CD80. De entre todos os recetores em estudo, o resultado mais surpreendente será o do CD21, cuja expressão proteica se sabe que existe em quase todos os linfomas caninos de células B (Wilkerson et al., 2005; Rao et al., 2011; Thalheim et al., 2013), mas que aqui se vê a sua expressão génica fortemente diminuída. Este fenómeno de discrepância entre a expressão génica e proteica já foi discutido e será devido, provavelmente, à regulação pós-transcricional. Deve-se fazer notar, no entanto, que a expressão génica de CD21 em linfoma B, apesar de estar diminuída relativamente ao grupo controlo, assemelha-se à expressão génica de CD20 (Gráfico 7), cuja proteína surge altamente expressa nestes animais doentes. Assim sendo, é recomendável quantificar-se as proteínas de interesse e comparar esses resultados com os dados aqui expostos.



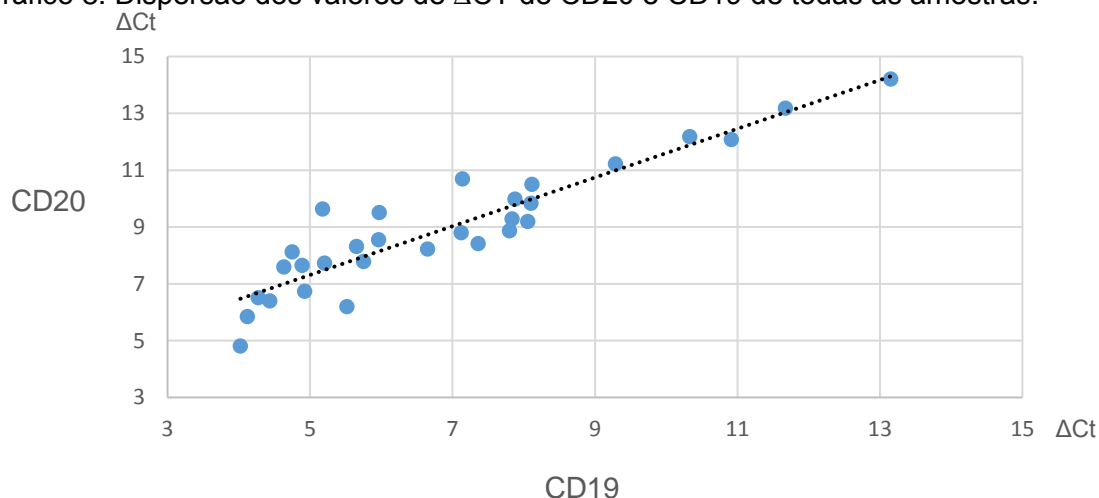
Gráfico 7: Distribuição dos valores de  $\Delta Ct$  por grupo.



Para finalizar a análise dos dados de qRT-PCR, foi testada a correlação entre a expressão dos recetores nos diferentes grupos. Uma correlação positiva entre dois recetores indica que os animais com maior expressão de um recetor também são os que têm maior expressão do outro recetor e *vice-versa*. Contrariamente, a correlação negativa significa que os animais com maior expressão de um recetor são os que têm menor expressão do outro recetor e *vice-versa*.

Analisando todas as amostras em conjunto, observa-se uma correlação positiva muito forte entre a expressão de CD19 e CD20 ( $Rho=0,9$ ) (Gráfico 8), assim como uma correlação positiva CD74-CD21 ( $Rho=0,47$ ) e CD74-CD80 ( $Rho=0,39$ ).

Gráfico 8: Dispersão dos valores de  $\Delta Ct$  de CD20 e CD19 de todas as amostras.



Prosseguiu-se a análise, desta vez só com o grupo de controlo ( $n=8$ ), e as correlações estatisticamente significativas estão indicadas na Tabela 14.



Tabela 14: Correlações estatisticamente significativas entre recetores no grupo controlo. Os restantes valores podem ser consultados no Anexo V.

Correlação entre:	<i>Rho</i>	Valor de <i>p</i>
CD19 e CD20	0,857	0,011
CD19 e CD21	0,905	0,005
CD19 e CD22	0,905	0,005
CD20 e CD21	0,976	$3,97 \times 10^{-4}$
CD20 e CD22	0,976	$3,97 \times 10^{-4}$
CD20 e CD80	0,786	0,028
CD21 e CD22	0,952	0,001
CD21 e CD80	0,762	0,037

Como esperado, pelas funções que desempenham nos linfócitos B e como corretores do BCR, em animais saudáveis o CD19, CD20, CD21 e CD22 apresentam correlações muito fortes entre si. Neste grupo não foi possível pôr em evidência nenhuma correlação que envolvesse o CD74, mas parece haver forte correlação CD80-CD20 e CD80-CD21. O grupo em estudo tem uma dimensão reduzida, portanto é possível que com uma amostra maior se evidenciem outras correlações significativas, como a CD80-CD22 ( $Rho=0,71$ ;  $p=0,058$ ).

De seguida foi feita uma análise semelhante no grupo dos animais com linfomas B ( $n=18$ ). As correlações estatisticamente significativas estão indicadas na Tabela 15.

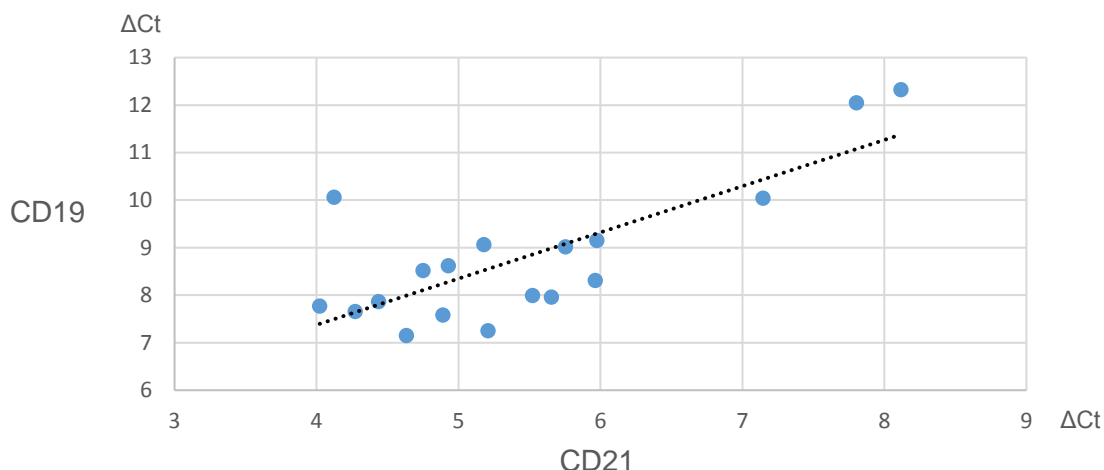
Tabela 15: Correlações estatisticamente significativas entre recetores nos animais com linfoma B. Os restantes valores podem ser consultados no Anexo V.

Correlação entre:	<i>Rho</i>	Valor de <i>p</i>
CD19 e CD20	0,818	$3,33 \times 10^{-5}$
CD19 e CD21	0,571	0,015
CD19 e CD74	0,649	0,004
CD20 e CD21	0,534	0,024
CD20 e CD74	0,800	$9,34 \times 10^{-5}$
CD20 e CD80	0,507	0,033

Em geral as correlações assumem valores inferiores no grupo dos animais com linfoma B. Aqui continua a haver correlação entre os CD19, CD20 e CD21, apesar de o CD22 não se correlacionar com nenhum outro recetor. Contrariamente ao grupo controlo, neste grupo o CD74 correlaciona-se com o CD20 e o CD19.

Tal como já foi referido anteriormente, a expressão de CD19 em linfomas B está aumentada e a de CD21 está diminuída, o que poderia não ser expectável uma vez que estes recetores atuam em conjunto. Intuitivamente pode parecer que há uma dissociação entre a expressão de CD19 e de CD21 nos linfomas B, no entanto verifica-se a existência de uma correlação positiva entre estes dois recetores (Tabela 15), ou seja, os animais que sofreram menor diminuição no CD21 são, tendencialmente, os que apresentam o maior aumento na expressão de CD19 (Gráfico 9).

Gráfico 9: Dispersão dos valores de  $\Delta Ct$  de CD19 e CD21 em animais com linfoma B.



#### 4.2. Valor prognóstico da expressão dos recetores.

Ao equacionar a existência de um *feedback* positivo entre o c-myc e o CD19 com a forte sobreexpressão de CD19 observada no linfoma B canino, e tendo em consideração que a ocorrência deste *feedback* está associada a formas agressivas de linfoma em humanos e murganhos (Chung et al., 2012; Poe et al., 2012), surge a dúvida se a expressão de CD19 se correlacionará com o prognóstico da doença. Assim sendo, comparou-se a expressão de CD19 com a sobrevida e a duração da remissão nos cães com linfoma B, todavia não foi possível demonstrar a existência de correlação entre as variáveis analisadas ( $p=0,8$ ;  $p=0,69$ ). Verificou-se uma redução muito acentuada na expressão génica de CD21 em todos os animais com linfoma aqui estudados, e sabendo que em DLBCL humano a expressão de CD21 está associada a um maior tempo de sobrevida (Otsuka et al., 2004), procurou-se saber se o mesmo ocorre no linfoma B canino com recurso aos valores de  $\Delta Ct$  de CD21 e aos tempos de sobrevida conhecidos ( $n=13$ ). O declive da reta de regressão assume um valor negativo, o que sugere maior sobrevivência quanto maior a expressão de CD21, no entanto não se observa uma correlação estatisticamente significativa entre as variáveis ( $Rho=-0,3$ ;  $p=0,33$ ). Tal como descrito por Rao e colaboradores (2011), a expressão de CD21 em cães não parece ser um fator de prognóstico no linfoma de células B.

Sabe-se que em neoplasias humanas existe uma relação de mau prognóstico com a maior expressão de CD74 (Stein et al., 2004), no entanto não há correlação entre o tempo de sobrevida ( $p=0,7$ ) e a duração da remissão ( $p=0,8$ ) com a expressão de CD74 no cão.

Também não foi evidenciada nenhuma correlação entre a expressão de CD20, CD22 e CD80 com o tempo de sobrevida nem com a duração da remissão ( $p\geq 0,05$ ).

## **5. Potencial dos recetores enquanto alvos de imunoterapia**

Finda a quantificação da expressão dos recetores, pode ser feita a avaliação do potencial de cada recetor como alvo para imunoterapia. Tenha-se presente que apesar de ser preferível ter como alvo terapêutico um recetor sobreexpresso, pode-se escolher uma proteína com expressão inferior, desde que a imunoterapia provoque a morte das células neoplásicas (Carter et al., 2004). Começando a avaliação pelos recetores subexpressos no linfoma B:

A expressão de CD80 ocorre numa grande variedade de células apresentadoras de antigénio, pelo que a imunoterapia anti-CD80 pode provocar toxicidade inespecífica e indesejada (Collins, Ling & Carreno, 2005; Mir, 2015). Esta proteína é, de entre todos os recetores avaliados, a que apresenta menor expressão em linfonodo saudável, sendo ainda menos expressa nos linfonodos de cães com linfoma B (Gráfico 7). A depleção de CD80 impede ainda a coestimulação do CD28 no linfócito T e causa um estado de anergia imunitária (Altman & Dang, 2012; Soskic et al., 2014). Tendo em conta os dados obtidos e a bibliografia, a imunoterapia direcionada contra o CD80 não será a mais indicada para o tratamento do linfoma B canino.

O CD74, tal como o CD80, e ao contrário dos restantes recetores estudados, não é uma proteína específica de células B porque também é expressa nas APC (Stein et al., 2007; Tizard, 2013a). Comparando com linfonodos de cães saudáveis, a sua expressão parece estar reduzida para metade quando há linfoma (Gráfico 5), mas é o recetor com a maior expressão observada (Gráficos 6 e 7). A internalização do CD74 induzida por anticorpos é muito rápida e resulta na sua degradação lisossomal, o que, conjuntamente com a constante renovação do recetor para membrana celular, o torna um alvo atraente para a imunoterapia passiva com anticorpos conjugados com fármacos ou radioisótopos (Hansen et al., 1996). Já foram feitos estudos com ADC anti-CD74 e não se observou toxicidade significativa (Stein et al., 2007), pelo que é possível que esta terapia em cão seja segura. Posto isto, o CD74 pode ter potencial como alvo de imunoterapia, mas também não é o mais indicado para as neoplasias aqui estudadas.

A bibliografia indica que o CD21 é frequentemente expresso nos linfomas B de cão (Wilkerson et al., 2005; Rao et al., 2011; Thalheim et al., 2013), mas os resultados deste trabalho revelam uma subexpressão muito acentuada no linfonodo dos animais doentes (Gráfico 7). A fraca capacidade de internalização deste recetor torna-o teoricamente menos adequado para a terapia com ADC (Ingle et al., 2008), e a existência de CD21 solúvel em circulação (Frémeaux-

Bacchi et al., 1996) que se ligue a anticorpos anti-CD21 pode limitar a eficácia dos mesmos no ataque ao tumor. Com base na bibliografia e nos dados apresentados nesta dissertação, o CD21 não parece ser um bom alvo de imunoterapia em linfoma canino.

Há várias características do CD22 que o tornam um bom candidato para imunoterapia. O CD22 é específico de células B e sabe-se que é expresso numa grande parte dos linfomas B humanos e também em DLBCL canino (Siegel et al., 2003; Seelig et al., 2016). Segundo os resultados apresentados neste trabalho, a expressão deste recetor é igual ou superior no linfonodo dos animais com linfoma B, relativamente aos linfonodos saudáveis (Gráfico 7). Ao ligar-se a anticorpos, o CD22 tem a capacidade de internalizar rapidamente e ser degradado (Shan & Press, 1995), o que permite a entrega intracelular de fármacos ou radioisótopos. Pelas razões apresentadas, a administração de ADC anti-CD22 poderá ser uma abordagem terapêutica viável no tratamento de linfoma B em cães.

O CD19 também é específico de células B e é expresso em 88% dos linfomas B humanos, mas não é expresso em células estaminais nem em plasmócitos (Del Nagro et al., 2005; Tizard, 2013a). A expressão de CD19 parece estar bastante aumentada no linfonodo de cães com linfoma B (Gráfico 5), e de entre os recetores aqui estudados este é o segundo mais expresso nos linfonodos doentes (Gráfico 7). Assemelhando-se ao CD22, o CD19 demonstra capacidade de internalização rápida induzida por anticorpos (Hansen et al., 1996). Sabe-se ainda que a expressão de CD21 reduz a internalização do CD19 (Ingle et al., 2008), mas é possível que a grande subexpressão de CD21 e a sobreexpressão de CD19 no linfoma B potenciem substancialmente a ação citotóxica dos ADC. A utilização de células T com recetor quimérico para antígeno anti-CD19 também revelou eficácia terapêutica em LNH de células B em humanos (Allegra et al., 2016; Davila & Sadelain, 2016), e é possível que esta mesma terapia possa ser desenvolvida e aperfeiçoada na espécie canina.

A proteína com maior enfoco neste trabalho é o CD20, tanto pela importância que demonstra no tratamento de linfoma B humano como pela crescente relevância na espécie canina. O CD20 demonstra bastante potencial por várias razões. A expressão desta proteína está limitada desde as células pré-B a linfócitos B, não sendo expressa nas células precursoras nem nos plasmócitos (Jubala et al., 2005; Kano et al., 2005; Youinou, Mankaï, Bordron & Berthou, 2008; Seelig et al., 2016). Esta característica permite atingir a depleção linfocitária temporária, sem sequelas a longo prazo. Observa-se ainda uma expressão significativamente elevada deste recetor nos linfonodos de cão com linfoma de células B relativamente ao grupo controlo (Gráfico 5). De entre os recetores aqui estudados, é o terceiro mais expresso em linfoma B (Gráfico 7), e esta forte sobreexpressão de CD20 foi corroborada através da avaliação da expressão proteica por Western Blot (Figura 11). A internalização induzida por anticorpos é mínima ou inexistente neste recetor (Jubala et al., 2005; Gabellier & Cartron, 2016), o que limita a libertação intracelular de fármacos ou radioisótopos conjugados, mas

permite a acumulação na membrana celular, levando à concentração dos mesmos no tumor. A acumulação de anticorpos não conjugados na membrana também tem potencial terapêutico, uma vez que estes podem induzir a apoptose e permitir a ADCC e a CDC (Cragg et al., 2005). Tendo em conta todas estas características do CD20, podem e devem ser ponderadas mais terapias com anticorpos, conjugados ou não, e terapia com CAR-T.

## **6. Limitações do estudo**

Foram encontradas algumas dificuldades na realização deste trabalho. Apesar de imensamente beneficiados pelo biobanco canino, os grupos em estudo são relativamente reduzidos e será necessário aumentar a casuística no futuro, incluindo casos de linfoma T. Outra limitação foi a dificuldade na obtenção de amostras do grupo controlo provenientes de animais saudáveis, devido a questões bioéticas, mas que foram aqui transpostas recorrendo-se a um biotério de experimentação. A falta de reagentes específicos para cão foi outro fator limitante, bem como a falta de estudos da expressão dos recetores em cão. A maioria dos artigos científicos que aborda este assunto faz apenas uma análise qualitativa da expressão dos recetores, existindo poucas fontes de comparação.

## **7. Perspetivas futuras**

Seria benéfico complementar este trabalho com outros estudos que avaliem outras proteínas características de linfoma, como por exemplo o CD40, ou *immune checkpoints*, como o CTLA-4, o PD-1 e o PD-L1. Para colmatar os resultados inconclusivos é aconselhável a realização de estudos semelhantes a este, mas com uma amostragem superior. Por outro lado, tendo em conta os mecanismos de regulação pós-transcricional, para validar os resultados obtidos deve ser feita a quantificação de proteína dos diferentes recetores. Posteriormente à validação dos recetores, segue-se o desenvolvimento da imunoterapia adequada consoante o tipo de alvo. No âmbito do projeto do linfoma canino, para além de se validar o CD20 como alvo de imunoterapia, foi desenvolvido um anticorpo anti-CD20, pelo que será interessante avaliar os seus efeitos terapêuticos *in vitro* e *in vivo*. Depois de se validar as imunoterapias, deve-se estudar a conjugação da imunoterapia com quimioterapia ou, por exemplo, de quimioterapia, anticorpos como o anti-CD20 e o bloqueio de *immune checkpoints*, porque as combinações têm revelado consistentemente melhores resultados do que as monoterapias (Cesano & Gayko, 2003; Ayl & Ohashi, 2015; Anderson & Modiano, 2015; Christian et al., 2015; Weiskopf et al., 2016).

## Capítulo V – Conclusão

A presente dissertação teve como objetivo caracterizar a expressão de vários recetores de membrana celular no linfoma canino e compará-los entre si.

Com a quantificação relativa feita neste trabalho foi possível concluir que há uma forte sobreexpressão génica do CD20 em linfoma canino de células B, tendo esta sido corroborada através da análise de proteína. Estes resultados estão de acordo com a bibliografia, mas até à data só foi feita uma caracterização qualitativa ou semiquantitativa da expressão do CD20 em linfoma canino. Verificou-se ainda que a sequência do CD20 é conservada em todos os animais deste estudo, apesar de apresentar algumas diferenças relativamente às sequências descritas pela bibliografia. Estas observações validam a utilização do CD20 como alvo de imunoterapia e reforçam os trabalhos já feitos nesse sentido. Com base nos dados relativos ao rituximab e outros mAb anti-CD20 já estudados, é provável que no futuro se inclua a imunoterapia direcionada ao CD20 no tratamento-padrão do linfoma B canino.

A quantificação da expressão génica das restantes proteínas de membrana permitiu a distinção entre os alvos promissores e os menos promissores para a imunoterapia no linfoma B canino. Por haver uma forte sobreexpressão de CD19, e tendo em conta as características desta proteína, o CD19 apresenta-se como o alvo mais promissor, a par do CD20, no uso para a imunoterapia. Tendo isso presente, é bastante aconselhável a sua avaliação proteica. Concluiu-se ainda que a expressão génica de CD21 se encontra profundamente diminuída em linfoma B do cão. Este facto diverge da bibliografia, pois está descrito que a expressão proteica de CD21 ocorre na esmagadora maioria dos linfomas B do cão. Para rejeitar o CD21 como alvo de imunoterapia será necessário fazer a avaliação quantitativa da sua expressão proteica. A expressão média de CD22 em linfoma B é equivalente ou superior à dos linfócitos B saudáveis, no entanto não foi possível distinguir estatisticamente o grupo controlo dos restantes, e o seu potencial para a imunoterapia foi classificado como intermédio. Observou-se também uma subexpressão significativa de CD74, mas considerou-se que possui um potencial intermédio para o tratamento de linfoma B, graças às características de internalização que apresenta. Para finalizar, concluiu-se que o CD80 surge significativamente subexpresso no linfoma canino de células B, e segundo os dados disponíveis, o CD80 não foi classificado como um alvo promissor para a imunoterapia de linfoma canino de células B. A reduzida casuística de linfomas T neste trabalho não permitiu a chegada a conclusões, pelo que serão necessários outros estudos com mais casos para avaliar alvos específicos de linfócitos T.

Conclui-se, por fim, que a aplicação do método de Ficoll aos tecidos a avaliar aumenta a sensibilidade do WB na deteção e quantificação da proteína, sendo recomendável a utilização do mesmo em estudos futuros, nomeadamente com o CD19 e CD22 caninos.

A presente dissertação apresenta um caráter progressista na caracterização da expressão de recetores do linfoma canino. Esta avaliação é importante para direcionar as escolhas nas linhas de investigação e facilitar o surgimento de novas imunoterapias que beneficiem o panorama oncológico da Medicina Veterinária. Num futuro próximo a imunoterapia poderá complementar a quimioterapia no tratamento do linfoma canino, contribuindo para o aumento do número de remissões e da duração das mesmas.

## Bibliografia

- Allegra, A., Innao, V., Gerace, D., Vaddinelli, D. & Musolino, C. (2016). Adoptive immunotherapy for hematological malignancies: Current status and new insights in chimeric antigen receptor T cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 62, 49–63.
- Altman, B.J. & Dang, C.V. (2012). Normal and cancer cell metabolism: lymphocytes and lymphoma. *The FEBS Journal*, 279(15), 2598–2609.
- Anderson, K.L. & Modiano, J.F. (2015). Progress in Adaptive Immunotherapy for Cancer in Companion Animals: Success on the Path to a Cure. *Veterinary Sciences*, 2(4), 363–387.
- Armand, P. (2015). Checkpoint blockade in lymphoma. *Hematology*, 15(1), 69–73.
- Ayl, R. & Ohashi, E. (2015). Monoclonal antibody therapy for canine lymphoma: Promoting the fight from within. Disponível em: <http://veterinarynews.dvm360.com/monoclonal-antibody-therapy-canine-lymphoma-promoting-fight-within>
- Berguig, G.Y., Convertine, A.J., Frayo, S., Kern, H.B., Procko, E., Roy, D., Srinivasan, S., Margineantu, D.H., Booth, G., Palanca-Wessels, M.C., Baker, D., Hockenbery, D., Press, O.W. & Stayton, P.S. (2015). Intracellular Delivery System for Antibody-Peptide Drug Conjugates. *Molecular Therapy*, 23(5), 907–917.
- Blanc, V., Bousseau, A., Caron, A., Carrez, C., Lutz, R.J. & Lambert, J.M. (2011). SAR3419 : An Anti-CD19-Maytansinoid Immunoconjugate for the Treatment of B-Cell Malignancies. *Clinical Cancer Research*, 17(20), 6448–6459.
- Bolognesi, A., Polito, L., Tazzari, P.L., Lemoli, R.M., Lubelli, C., Fogli, M., Boon, L., De Boer, M. & Stirpe, F. (2000). In vitro anti-tumour activity of anti-CD80 and anti-CD86 immunotoxins containing type 1 ribosome-inactivating proteins. *British Journal of Haematology*, 110(2), 351–361.
- Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Freeman, G.J. & Sharpe, A.H. (2007). PD-L1 interacts specifically with B7-1 to inhibit T cell proliferation. *Immunity*, 27(1), 111–122.
- Cang, S., Mukhi, N., Wang, K. & Liu, D. (2012). Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 5.
- Carter, P., Smith, L. & Ryan, M. (2004). Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocrine-Related Cancer*, 11(4), 659–687.
- Cesano, A. & Gayko, U. (2003). CD22 as a Target of Passive Immunotherapy. *Seminars in Oncology*, 30(2), 253–257.



- Chen, G., Gharib, T.G., Huang, C., Taylor, J.M.G., Misek, D.E., Kardia, S.L.R., Giordano, T.J., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., Hanash, S.M. & Beer, D.G. (2002). Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas. *Molecular and Cellular Proteomics*, 1(4), 304–313.
- Christian, B.A., Poi, M., Jones, A., Porcu, P., Flynn, J.M., Benson Jr, D.M., Phelps, M.A., Wei, L., Byrd, J.C., Wegener, W.A., Goldenberg, D.M., Baiocchi, R.A. & Blum, K.A.(2015). The combination of milatuzumab, a humanized anti-CD74 antibody, and velutuzumab, a humanized anti-CD20 antibody, demonstrates activity in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *British Journal of Haematology*, 169(5), 701–710.
- Chung, E.Y., Psathas, J.N., Yu, D., Li, Y., Weiss, M.J. & Thomas-Tikhonenko, A. (2012). CD19 is a major B cell receptor-independent activator of MYC-driven B-lymphomagenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(6), 2257–2266.
- Clark, E.A. & Ledbetter, J.A. (1989). Structure, function, and genetics of human B cell-associated surface molecules. *Advances in Cancer Research*, 52(1), 81–149.
- Collins, M., Ling, V. & Carreno, B.M. (2005). Protein family review The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biology*, 6(6).
- Cragg, M.S., Walshe, C.A., Ivanov, A.O. & Glennie, M.J. (2005). The Biology of CD20 and Its Potential as a Target for mAb Therapy. In *B Cell Trophic Factors and B Cell Antagonism in Autoimmune Disease* (Vol. 8, pp. 140–174).
- Creative Biolabs (2018). What Is CD19 Antigen?. *Chimeric Antigen Receptor Research*. Disponível em <https://www.creative-biolabs.com/blog/car-t/what-is-cd19-antigen/>
- Curran, K.M., Schaffer, P.A., Frank, C.B., Lana, S.E., Hamil, L.E., Burton, J.H., Labadie, J., Ehrhart, E.J. & Avery, P.R. (2017). BCL2 and MYC are expressed at high levels in canine diffuse large B-cell lymphoma but are not predictive for outcome in dogs treated with CHOP chemotherapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(4), 1269–1279.
- Czuczman, M.S., Straus, D.J., Divgi, C.R., Graham, M., Garin-Chesa, P., Finn, R., Myers, J., Old, L.J., Larson, S.M. & Scheinberg, D.A. (1993). Phase I dose-escalation trial of iodine 131-labeled monoclonal antibody OKB7 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 11(10), 2021–2029.
- Davila, M.L. & Sadelain, M. (2016). Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies. *International Journal of Hematology*, 104(1), 6–17.

- Del Nagro, C.J., Otero, D.C., Anzelon, A.N., Omori, S.A., Kolla, R.V. & Rickert, R.C. (2005). CD19 Function in Central and Peripheral B-Cell Development. *Immunologic Research*, 31(2), 119–131.
- Direção-Geral da Saúde (2016). Portugal - Doenças Oncológicas em Números - 2015. *Programa Nacional Para as Doenças Oncológicas*. Disponível em <https://www.dgs.pt/em-destaque/portugal-doencas-oncologicas-em-numeros-201511.aspx>
- Engelhard, M. (2016). Anti-CD20 antibody treatment of non-Hodgkin lymphomas. *Clinical Immunology*, 172(1), 101–104.
- Ettinger, S.J., Feldman, E.C. & Côté, E. (2016). *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (8th ed.).
- Faldyna, M., Samankova, P., Leva, L., Cerny, J., Oujezdska, J., Rehakova, Z. & Sinkora, J. (2007). Cross-reactive anti-human monoclonal antibodies as a tool for B-cell identification in dogs and pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 119(1–2), 56–62.
- Freire, M. (2018). *Análise de Recetores de Superfície em Linfócitos de Pacientes Caninos com Linfoma B*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade e Medicina Veterinária- Universidade de Lisboa.
- Frémeaux-Bacchi, V., Bernard, I., Maillet, J.C., Fontaine, M., Bonnefoy, J.Y., Kazatchkine, M. & Fischer, E. (1996). Human lymphocytes shed a soluble form of CD21 (the C3dg/Epstein-Barr virus receptor, CR2) that binds iC3b and CD23. *European Journal of Immunology*, 26(7), 1497–1503.
- Gabellier, L. & Cartron, G. (2016). Obinutuzumab for relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Therapeutic Advances in Hematology*, 7(2), 85–93.
- Galanina, N., Kline, J. & Bishop, M.R. (2017). Emerging role of checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Therapeutic Advances in Hematology*, 8(2), 81–90.
- Gavazza, A., Lubas, G., Fridman, A., Peruzzi, D., Impellizeri, J.A., Luberto, L., Marra, E., Roscilli, G., Ciliberto, G. & Aurisicchio, L. (2013). Safety and Efficacy of a Genetic Vaccine Targeting Telomerase Plus Chemotherapy for the Therapy of Canine B-Cell Lymphoma. *Human Gene Therapy*, 24(8), 728–738.
- Gentschev, I., Patil, S.S., Petrov, I., Cappello, J., Adelfinger, M. & Szalay, A.A. (2014). Oncolytic Virotherapy of Canine and Feline Cancer. *Viruses*, 6(5), 2122–2137.
- GfK. (2015). Portugal é um país Pet-Friendly. Disponível em: <https://www.gfk.com/pt/insights/press-release/portugal-e-um-pais-pet-friendly/>

- Glennie, M.J., Honeychurch, J., French, R.R. & Tutt, A.L. (2000). The Application of Monoclonal Antibodies in the Treatment of Lymphoma. In *Diagnostic and Therapeutic Antibodies* (Vol. 40, pp. 85–97).
- Glennie, M.J. & van de Winkel, J.G.J. (2003). Renaissance of cancer therapeutic antibodies. *Drug Discovery Today*, 8(11), 503–510.
- Haile, S.T., Horn, L.A. & Ostrand-Rosenberg, S. (2014). A Soluble Form of CD80 Enhances Antitumor Immunity by Neutralizing Programmed Death Ligand-1 and Simultaneously Providing Costimulation. *Cancer Immunology Research*, 2(7), 610–615.
- Hansen, H.J., Ong, G.L., Diril, H., Valdez, A., Roche, P.A., Griffiths, G.L., Goldenberg, D.M. & Mattes, M.J. (1996). Internalization and catabolism of radiolabelled antibodies to the MHC class-II invariant chain by B-cell lymphomas. *Biochemical Journal*, 300(1), 293–300.
- Hariharan, K., Chu, P., Murphy, T., Clanton, D., Berquist, L., Molina, A., Ho, S.N., Vega, M.I. & Bonavida, B. (2013). Galiximab (anti-CD80)-induced growth inhibition and prolongation of survival in vivo of B-NHL tumor xenografts and potentiation by the combination with fludarabine. *International Journal of Oncology*, 43(2), 670–676.
- Hiraga, J., Tomita, A., Sugimoto, T., Shimada, K., Ito, M., Nakamura, S., Kiyoi, H., Kinoshita, T. & Naoe, T. (2009). Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood*, 113(20), 4885–4893.
- Impellizeri, J.A., Howell, K., McKeever, K.P. & Crow, S.E. (2006). The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: An ex vivo evaluation. *The Veterinary Journal*, 171(3), 556–558.
- Ingle, G.S., Chan, P., Elliott, J.M., Chang, W.S. & Koeppen, H. (2008). High CD21 expression inhibits internalization of anti-CD19 antibodies and cytotoxicity of an anti-CD19-drug conjugate. *British Journal of Haematology*, 140(1), 46–58.
- Ito, D., Brewer, S., Modiano, J.F. & Beall, M.J. (2015). Development of a novel anti-canine CD20 monoclonal antibody with diagnostic and therapeutic potential. *Leukemia & Lymphoma*, 56(1), 219–225.
- Ito, D., Frantz, A.M. & Modiano, J.F. (2014). Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 159(3–4), 192–201.

- Johnson, N.A., Leach, S., Woolcock, B., DeLeew, R.J., Bashashati, A., Sehn, L.H., Connors, J.M., Chhanabhai, M., Brooks-Wilson, A. & Gascoyne, R.D. (2009). CD20 mutations involving the rituximab epitope are rare in diffuse large B-cell lymphomas and are not a significant cause of R-CHOP failure. *Haematologica*, 94(3), 423–427.
- Jubala, C.M., Wojcieszyn, J.W., Valli, V.E.O., Getzy, D.M., Fosmire, S.P., Coffey, D., Bellgrau, D. & Modiano, J.F. (2005). CD20 Expression in Normal Canine B Cells and in Canine non-Hodgkin Lymphoma. *Veterinary Pathology*, 42(4), 468–476.
- June, C.H., Warshauer, J.T. & Bluestone, J.A. (2017). Is autoimmunity the Achilles' heel of cancer immunotherapy? *Nature Medicine*, 23(5), 540–547.
- Kano, R., Inoie, C., Okano, H., Yamazaki, J., Takahashi, T., Watari, T., Tokuriki, M. & Hasegawa, A. (2005). Canine CD20 gene. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(3–4), 265–268.
- Karmali, R. & Gordon, L.I. (2017). Molecular Subtyping in Diffuse Large B Cell Lymphoma: Closer to an Approach of Precision Therapy. *Current Treatment Options in Oncology*, 18(2).
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N. & Sternberg, M.J.E. (2015). Europe PMC Funders Group The Phyre2 web portal for protein modelling , prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858.
- Kelm, S., Gerlach, J., Brossmer, R., Danzer, C. & Nitschke, L. (2002). The Ligand-binding Domain of CD22 Is Needed for Inhibition of the B Cell Receptor Signal , as Demonstrated by a Novel Human CD22-specific Inhibitor Compound. *Journal of Experimental Medicine*, 195(9), 1207–1213.
- Klingemann, H. (2018). Immunotherapy for Dogs: Running Behind Humans. *Frontiers in Immunology*, 9(133).
- LeBien, T.W. & Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes : how they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570–1581.
- Leonard, B.J.P., Coleman, M., Ketas, J.C., Chadburn, A., Ely, S., Furman, R.R., Wegener, W.A., Hansen, H.J., Ziccardi, H., Eschenberg, M., Gayko, U., Cesano, A. & Goldenberg, D.M. (2003). Phase I/II Trial of Epratuzumab (Humanized Anti-CD22 Antibody) in Indolent Non-Hodgkin's Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 21(16), 3051–3059.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*, 25(4), 402–408.

- Marconato, L., Gelain, M.E. & Comazzi, S. (2012). The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematological Oncology*, 31(1), 1–9.
- Marconato, L., Leo, C., Girelli, R., Salvi, S., Abramo, F., Bettini, G., Comazzi, S., Nardi, P., Albanese, F. & Zini, E. (2009). Association between Waste Management and Cancer in Companion Animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(3), 564–569.
- Mian, M., Augustin, F., Kocher, F., Gunsilius, E., Willenbacher, W., Zabernigg, A., Zangerl, G., Oexle, H., Schreieck, S., Schnallinger, M. & Fiegl, M. (2014). A Success Story: How a Single Targeted-Therapy Molecule Impacted on Treatment and Outcome of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Anticancer Research*, 34(5), 2559–2564.
- Mir, M.A. & Agrewala, J.N. (2008). Signaling through CD80: an approach for treating lymphomas. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12(8), 969–979.
- Mir, M.A. (2015). Costimulation in Lymphomas and Cancers. In *Developing Costimulatory Molecules for Immunotherapy of Diseases* (pp. 185–254).
- Morris, J. & Dobson, J. (2001). Haematopoietic System. In J. Morris, J. Dobson, *Small Animal Oncology*. (pp. 228 – 239). Oxford: Blackwell Science.
- Nagorsen, D., Kufer, P., Baeuerle, P.A. & Bargou, R. (2012). Pharmacology & Therapeutics Blinatumomab: A historical perspective. *Pharmacology and Therapeutics*, 136(3), 334–342.
- National Canine Cancer Foundation. (2015). Lymphoma. Disponível em: <http://wearethecure.org/learn-more-about-canine-cancer/canine-cancer-library/lymphoma/>
- Nelson, R.W. & Couto, C.G. (2014). *Small Animal Internal Medicine* (5<sup>a</sup> ed.).
- O'Connor, C.M., Sheppard, S., Hartline, C.A., Huls, H., Johnson, M., Palla, S.L., Maiti, S., Ma, W., Davis, R.E., Craig, S., Lee, D.A., Champlin, R., Wilson, H. & Cooper, L.J.N. (2012). Adoptive T-cell therapy improves treatment of canine non-Hodgkin lymphoma post chemotherapy. *Scientific Reports*, 2(249).
- O'Connor, C.M. & Wilson-Robles, H. (2014). Developing T Cell Cancer Immunotherapy in the Dog with Lymphoma. *ILAR Journal*, 55(1), 169–181.
- OMS. (2015). GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- Otsuka, M. & Yakushijin, Y. (2004). Role of CD21 antigen in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical significance. *British Journal of Haematology*, 127(4), 416–424.

- Owen, L. N. (1980). TNM Classification of tumours in domestic animals. Geneva, *World Health Organization*.
- Panjwani, M.K., Smith, J.B., Schutsky, K., Gnanandarajah, J., Connor, C.M.O., Jr, D.J.P. & Mason, N.J. (2016). Feasibility and Safety of RNA-transfected CD20-specific Chimeric Antigen Receptor T Cells in Dogs with Spontaneous B Cell Lymphoma, *24*(9), 1602–1614.
- Paoloni, M. & Khanna, C. (2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews Cancer*, *8*(2), 147–156.
- Park, J.S., Withers, S.S., Modiano, J.F., Kent, M.S., Chen, M., Luna, J.I., Culp, W.T.N., Sparger, E.E., Rebhun, R.B., Monjazeb, A.M., Murphy, W.J. & Canter, R.J. (2016). Canine cancer immunotherapy studies: linking mouse and human. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *4*(1), 97.
- Pianko, M.J., Liu, Y., Bagchi, S. & Lesokhin, A.M. (2017). Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. *Stem Cell Investigation*, *4*(32).
- Poe, J.C. & Tedder, T.F. (2012). CD22 and Siglec-G in B cell function and tolerance. *Trends in Immunology*, *33*(8), 413–420.
- Poe, J.C., Minard-Colin, V., Kountikov, E.I., Haas, K.M. & Tedder, T.F. (2012). A c-Myc and Surface CD19 Signaling Amplification Loop Promotes B Cell Lymphoma Development and Progression in Mice. *The Journal of Immunology*, *189*(5), 2318–2325.
- Polyak, M.J. & Deans, J.P. (2002). Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood*, *99*(9), 3256–3263.
- Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C.H. (2011). Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *365*(8), 725–733.
- Pundir, S., Martin, M.J. & O'Donovan, C. (2017). UniProt Protein Knowledgebase. *Protein Bioinformatics*, *1558*, 41–55.
- Ramarathinam, L., Castle, M., Wu, Y. & Liu, Y. (1994). T Cell Costimulation by B7/BB1 Induces CD8 T Cell-dependent Tumor Rejection: An Important Role of B7/BB1 in the Induction, Recruitment, and Effector Function of Antitumor T Cells. *Journal of Experimental Medicine*, *179*(4), 1205–1214.

- Rao, S., Lana, S., Eickhoff, J., Marcus, E., Avery, P.R., Morley, P.S. & Avery, A.C. (2011). Class II Major Histocompatibility Complex Expression and Cell Size Independently Predict Survival in Canine B-Cell Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(5), 1097–1105.
- Reif, J., Lower, K. & Ogilvie, G. (1995). Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma. *American Journal of Epidemiology*, 141(4), 352–359.
- Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, 348(6230), 62–68.
- Rue, S.M., Eckelman, B.P., Efe, J.A., Bloink, K., Deveraux, Q.L., Lowery, D. & Nasoff, M. (2015). Identification of a candidate therapeutic antibody for treatment of canine B-cell lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 164(3–4), 148–159.
- Rütgen, B.C., Hammer, S.E., Gerner, W., Christian, M., Arespacochaga, A.G., Willmann, M., Kleiter, M., Schwendenwein, I. & Saalmüller, A. (2010). Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma. *Leukemia Research*, 34(7), 932–938.
- Rütgen, B.C., Willenbrock, S., Reimann-Berg, N., Walter, I., Fuchs-Baumgartinger, A., Wagner, S., Kovacic, B., Essler, S.E., Schwendenwein, I., Nolte, I., Saalmüller, A. & Escobar, H.M. (2012). Authentication of Primordial Characteristics of the CLBL- 1 Cell Line Prove the Integrity of a Canine B-Cell Lymphoma in a Murine In Vivo Model. *PLoS One*, 7(6).
- Seelig, D.M., Avery, A.C., Ehrhart, E.J. & Linden, M.A. (2016). The Comparative Diagnostic Features of Canine and Human Lymphoma. *Veterinary Sciences*, 3(2).
- Shan, D. & Press, O.W. (1995). Constitutive endocytosis and degradation of CD22 by human B cells. *The Journal of Immunology*, 154(9), 4466–4475.
- Siegel, A.B., Goldenberg, D.M., Cesano, A., Coleman, M. & Leonard, J.P. (2003). CD22-Directed Monoclonal Antibody Therapy for Lymphoma. *Seminars in Oncology*, 30(4), 457–464.
- Singh, N.P., Yolcu, E.S., Taylor, D.D., Gercel-Taylor, C., Metzinger, D.S., Dreisbach, S.K. & Shirwan, H. (2003). A Novel Approach to Cancer Immunotherapy: Tumor Cells Decorated with CD80 Generate Effective Antitumor Immunity. *Cancer Research*, 63(14), 4067–4073.

- Soskic, B., Qureshi, O.S., Hou, T. & Sansom, D.M. (2014). A Transendocytosis Perspective on the CD28/CTLA-4 Pathway. In *Advances in Immunology* (1st ed., Vol. 124, pp. 95–136). Elsevier Inc.
- Starrak, G.S., Berry, C.R., Page, R.L., Johnson, J.L. & Thrall, D.E. (1997). Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 38(6), 411–418.
- Stein, R., Mattes, M.J., Cardillo, T.M., Hansen, H.J., Chang, C.H., Burton, J., Govindan, S. & Goldenberg, D.M. (2007). CD74 : A New Candidate T arget for the Immunotherapy of B-Cell Neoplasms. *Clinical Cancer Research*, 13(18), 5556–5563.
- Stein, R., Qu, Z., Cardillo, T.M., Chen, S., Rosario, A., Horak, I.D., Hansen, H.J. & Goldenberg, D.M. (2004). Antiproliferative activity of a humanized anti-CD74 monoclonal antibody, hLL1, on B-cell malignancies. *Blood*, 104(12), 3705–3711.
- Su, H., Na, N., Zhang, X. & Zhao, Y. (2017). The biological function and significance of CD74 in immune diseases. *Inflammation Research*, 66(3), 209–216.
- Suvas, S., Singh, V., Sahdev, S., Vohra, H. & Agrewala, J.N. (2002). Distinct Role of CD80 and CD86 in the Regulation of the Activation of B Cell and B Cell Lymphoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7766–7775.
- Takashima-Uebelhoeer, B.B., Barber, L.G., Zagarins, S.E., Procter-Gray, E., Gollenberg, A.L., Moore, A.S. & Bertone-Johnson, E.R. (2012). Household Chemical Exposures and the Risk of Canine Malignant Lymphoma, a Model for Human Non-Hodgkin's Lymphoma. *Environmental Research*, 112, 171–176.
- Tanimoto, M., Scheinberg, D.A., Cordon-Cardo, C., Huie, D., Clarkson, B.D. & Old, L.J. (1989). Restricted expression of an early myeloid and monocytic cell surface antigen defined by monoclonal antibody M195. *Leukemia*, 3(5), 339–348.
- Teske, E. (1994). Canine malignant lymphoma: A review and comparison with human non-hodgkin's lymphoma. *Veterinary Quarterly*, 16(4), 209–219.
- Thalheim, L., Williams, L.E., Borst, L.B., Fogle, J.E. & Suter, S.E. (2013). Lymphoma Immunophenotype of Dogs Determined by Immunohistochemistry, Flow Cytometry, and Polymerase Chain Reaction for Antigen Receptor Rearrangements. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(5), 1509–1516.



- Tian, Q., Stepaniants, S.B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M.C., Doyle, M.J., Yi, E.C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J., Goodlett, D., Berger, J.P., Gunter, B., Linseley, P.S., Stoughton, R.B., Aebersold, R., Collins, S.J., Hanlon, W.A. & Hood, L.E. (2004). Integrated Genomic and Proteomic Analyses of Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Proteomics*, 3(10), 960–969.
- Tizard, I. (2013a). B Cells and their Response to Antigen. *Veterinary Immunology* (9<sup>a</sup> ed., pp. 150–164).
- Tizard, I. (2013b). Antibodies: Soluble Antigen Receptors. *Veterinary Immunology* (9<sup>a</sup> ed., pp. 165–174).
- Tizard, I. (2013c). Resistance to tumors. *Veterinary Immunology* (9<sup>a</sup> ed., pp. 388–399).
- Vail, D.M. & Young, K.M. (2007). Hematopoietic Tumors. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (4<sup>a</sup> ed). (pp 699-722). Missouri: Saunders Elsevier.
- Valli, V.E., Myint, M.S., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., Durham, A., Ehrhart, E.J., Johnson, Y., Jones, C., Kiupel, M., Labelle, P., Lester, S., Miller, M., Moore, P., Moroff, S., Roccabianca, P., Ramos-Vara, J., Ross, A., Scase, T., Tvedten, H. & Vernau, W. (2011). Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. *Veterinary Pathology*, 48(1), 198–211.
- Villamil, J.A., Henry, C.J., Hahn, A.W., Bryan, J.N., Tyler, J.W. & Caldwell, C.W. (2009). Hormonal and Sex Impact on the Epidemiology of Canine Lymphoma. *Journal of Cancer Epidemiology*, 2009.
- Villarnovo, D., McCleary-Wheeler, A.L. & Richards, K.L. (2017). Barking up the right tree: advancing our understanding and treatment of lymphoma with a spontaneous canine model. *Current Opinion in Hematology*, 24(4), 359–366.
- Vinjamaram, S., Czuczman, M.S. & Hernandez-Ilizaliturri, F.J. (2008). The Use of Galiximab in Non-Hodgkin Lymphoma. *Clinical Lymphoma & Myeloma*, 8(5), 277–282.
- Wang, K., Wei, G. & Liu, D. (2012). CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental Hematology & Oncology*, 1(36), 1–7.
- Weiskopf, K., Anderson, K.L., Ito, D., Schnorr, P.J., Tomiyasu, H., Ring, A.M., Bloink, K., Efe, J., Rue, S., Lowery, D., Barkal, A., Prohaska, S., Mckenna, K., Cornax, I., O'Brien, T.D., O'Sullivan, M.G., Weissman, I.L. & Modiano, J.F. (2016). Eradication of Canine Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Murine Xenograft Model with CD47 Blockade and Anti-CD20. *Cancer Immunology Research*, 4(12), 1072–1087.

- Wilkerson, M.J., Dolce, K., Koopman, T., Shuman, W., Chun, R., Garrett, L., Barber, L. & Avery, A. (2005). Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106(3–4), 179–196.
- Yang, S. & Sim, G.K. (1999). New forms of dog CD80 and CD86 transcripts that encode secreted B7 molecules. *Immunogenetics*, 50(5–6), 349–353.
- Youinou, P., Mankaï, A., Bordron, A. & Berthou, C. (2008). Features of Rituximab-Induced Killing of B Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 68, 118–119.
- Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review. *Veterinary Quarterly*, 36(2), 76–104.

## **Anexo I: Abstract da comunicação oral “Histone deacetylase inhibitors – a novel therapy for canine lymphoma”.**

Dias, J.<sup>1</sup>, Gil, S.<sup>1</sup>, Aguiar, S.<sup>1</sup>, Andre A.<sup>1</sup>, Almeida, A.<sup>1</sup>, Rütgen, B.<sup>2</sup>, Vicente, G.<sup>3</sup>, Tavares, L.<sup>1</sup> and Aires-da-Silva, F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup> Clinical Pathology, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinärplatz 1, Vienna, 1210, Austria.

<sup>3</sup> Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal.

Cancer is among the leading causes of death worldwide and lymphoma is one of the most common tumors, accounting for approximately 4% of all tumors in the USA. Therapeutic options for humans with lymphoma have improved remarkably, still almost all patients with low-grade lymphoma and approximately 50% of patients with high-grade lymphoma die of this disease. Canine lymphoma and human non-Hodgkin lymphoma (NHL) share many histopathological, molecular, genetic and clinical features, making the canine species an excellent animal model for the research of novel therapeutic agents and approaches for lymphoma. Lymphoma comprises 83% of all canine hematopoietic malignancies and 7- 24% of all canine neoplasias, and appears its frequency is increasing. Lymphoma as an heterogeneous disease presents a wide variation in clinical presentations and histological subtypes, however, most dogs have generalized lymphadenopathy (multicentric form) and intermediate to high-grade lymphoma, more commonly of B-cell origin. As a systemic disease, canine multicentric lymphoma requires chemotherapy to achieve temporary remission and prolonged survival. The CHOP based protocols remain the most effective therapy, however cure is rarely achieved and the majority of dogs relapse with lethal, drugresistant disease. The 12 month median survival barrier and the 20% to 25% two years survival rates attained with conventional therapy demonstrate an urgent and unmet need in veterinary medicine to develop new treatment strategies for refractory disease. HDACis, molecules that inhibit histone deacetylase, have emerged as a powerful new class of anti-cancer drugs. Histone deacetylases (HDACs) catalyse the deacetylation from histones (and other acetyl-lysine-containing proteins), leading to chromatin condensation and transcriptional repression. By inhibiting deacetylating enzymes activity, HDACi regulate aberrant deacetylation and modify gene expression in cancer cells, culminating in cytotoxicity. Hematological malignancies seem to be particularly sensitive to HDACis. To date, three HDAC inhibitors have been approved for cancer therapy by the US Food and Drug Administration (FDA) – vorinostat, romidepsin and belinostat - for T-cell lymphoma treatment. Since HDACi have shown great promise, we explored HDACi therapeutics properties for the treatment of canine lymphoma. For that, a library of HDACi compounds was screened on CLBL-1, a canine lymphoma cell line. Briefly,

CLB-I cells were subjected to increasing concentrations of HDACi's and then cell viability and proliferation were assessed using Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche), according to manufacturer instructions. Results showed that HDACi compounds presented cytotoxic effect on CLBL1 and allowed the selection of a panel of promising drugs for further investigation. In order to elucidate the mechanisms of action underlying the cytotoxic effect, immunoblotting studies were performed. Results demonstrated clear histone deacetylation status of CLBL-1 after 24h with HDACi treatment when compared with non-treated cells. Moreover, a canine lymphoma biobank was successfully constructed from lymph nodes collected from dogs diagnosed with lymphoma and currently we are evaluating the HDACi cytotoxic effects on these primary canine lymphoma biological samples. These preliminary data suggest that HDACi therapy might be a promising novel single/adjunct agent in canine lymphoma treatment.

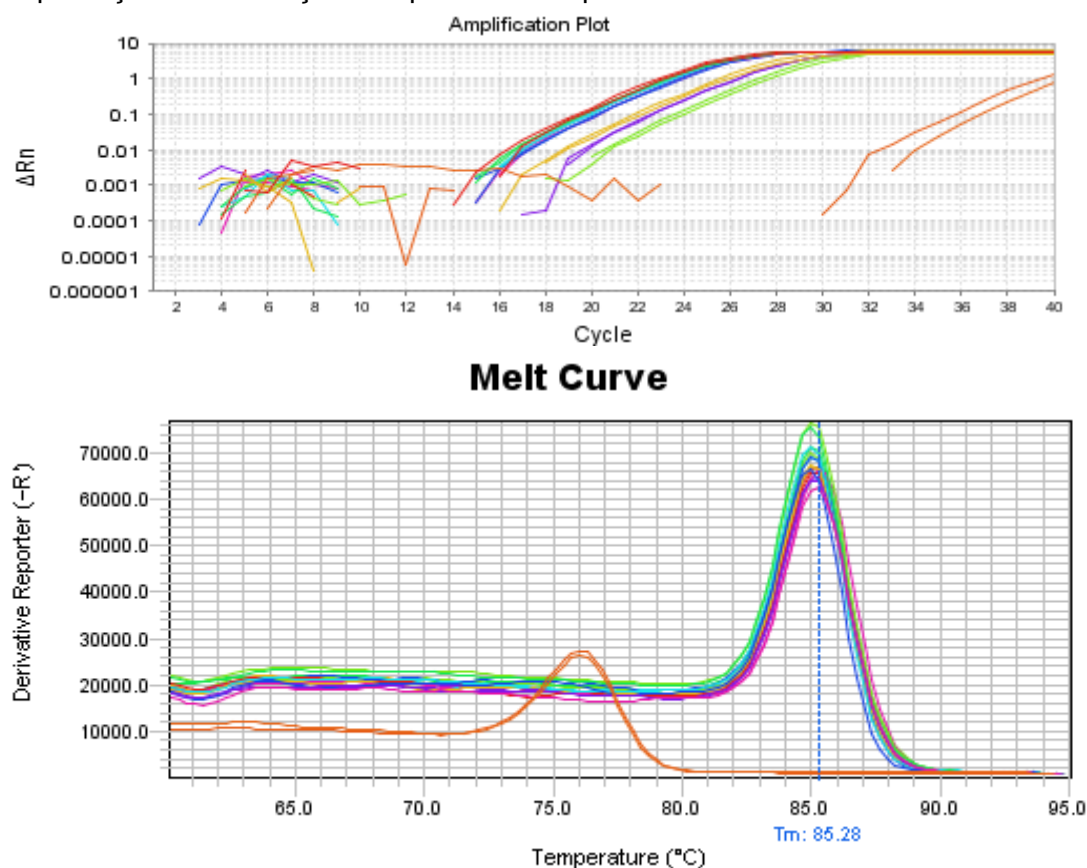
1. Catalano, G. et al (2012) Cytotoxic activity of the histone deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in anaplastic thyroid cancer in vitro and in vivo, *International Journal of Cancer*, 130(3), 694–704.
2. West A. & Johnstone (2014), New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment, *J Clin Invest.*, 124(1):30-39.
3. Zain, J. (2010) Role of Histone Deacetylase Inhibitors in the Treatment of Lymphomas and Multiple Myeloma, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 3(26), 671-704.
4. Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review. *Vet. Q.* 36, 76–104

## Anexo II: Dados dos animais diagnosticados com linfoma.

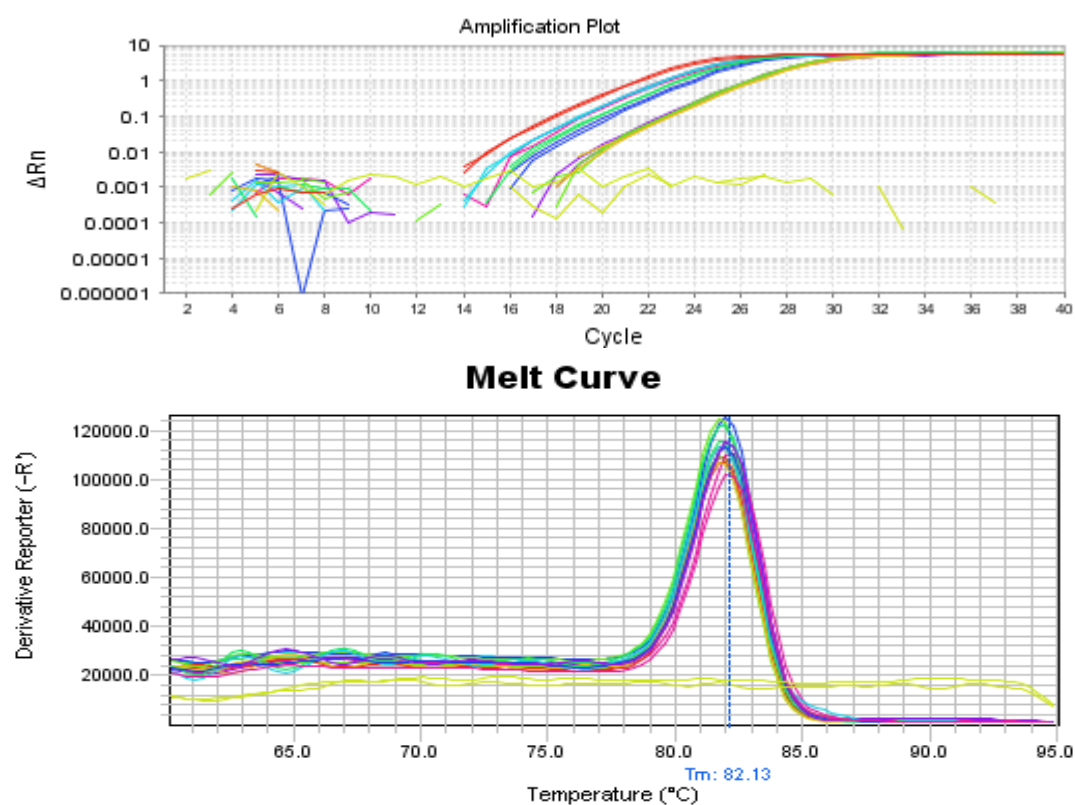
	Idade	Sexo	Raça	Estádio OMS	Imunohistoquímica
A1	12	M	Schnauzer	Vb	B
A2	15	M	Indeterminada	Vb	T
A3	8	M	Labrador	Vb	B
A4	12	M	Labrador	Vb	Não-B, não-T
B1	6	M	Rottweiler	IVb	B
B2	6	F	Basset Hound	IVb	B
B3	12	F	Pittbull	Vb	B
B4	12	F	Husky	Vb	B
B5	8	M	Indeterminada	IVb	B
B6	11	F	Indeterminada	Ila	B
B7	9	F	Boxer	Vb	B
B8	7	M	Pointer	IVa	B
B9	17	F	Indeterminada	IVb	B
B10	3	F	Pastor Alemão	IVb	B
B11	8	M	Indeterminada	IVb	B
B13	9	M	Indeterminada	IVb	T
B14	4	M	Golden Retriever	IVb	B
B15	8	M	Beagle	IVb	T
B16	5	M	Labrador	IVb	B
B17	9	F	Caniche	Vb	B
B18	11	F	Doberman	Vb	B
B19	9	M	Galgo Afegão	Vb	B

### Anexo III: Curvas de amplificação e curvas de dissociação de qRT-PCR.

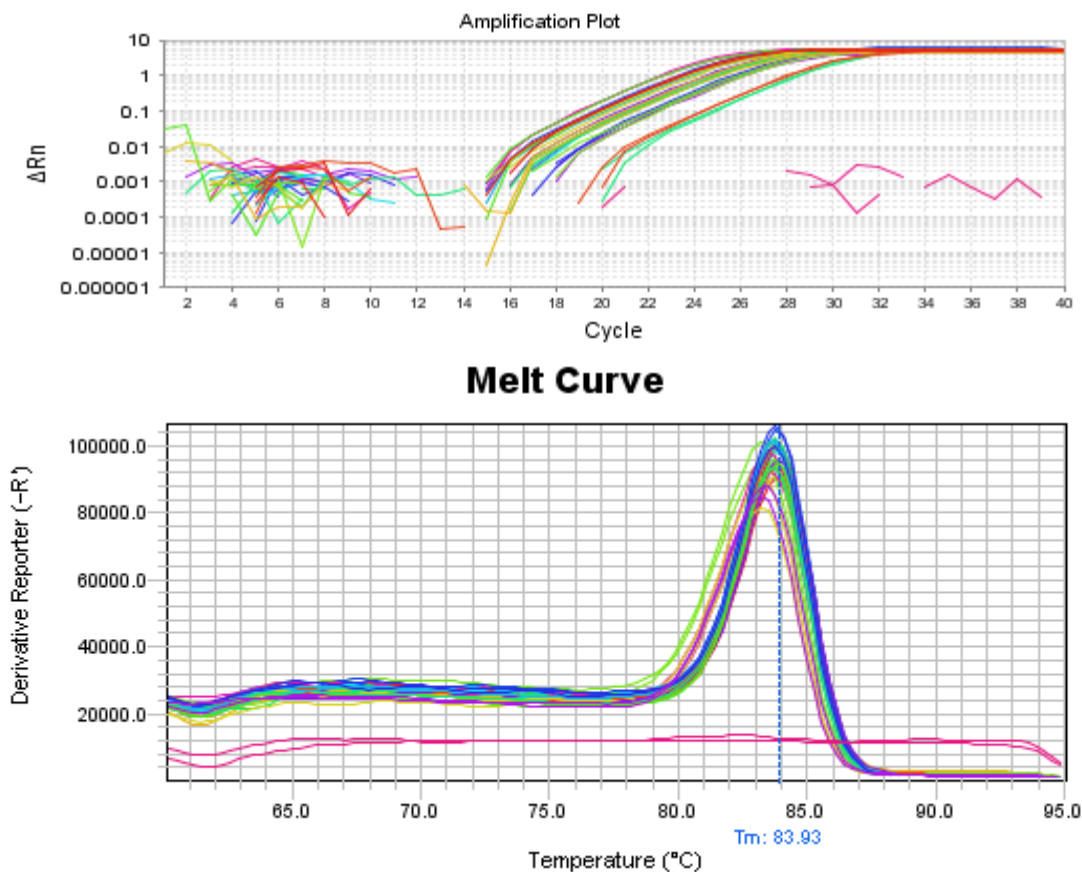
Amplificação e dissociação dos produtos de qRT-PCR de CD19 canino:



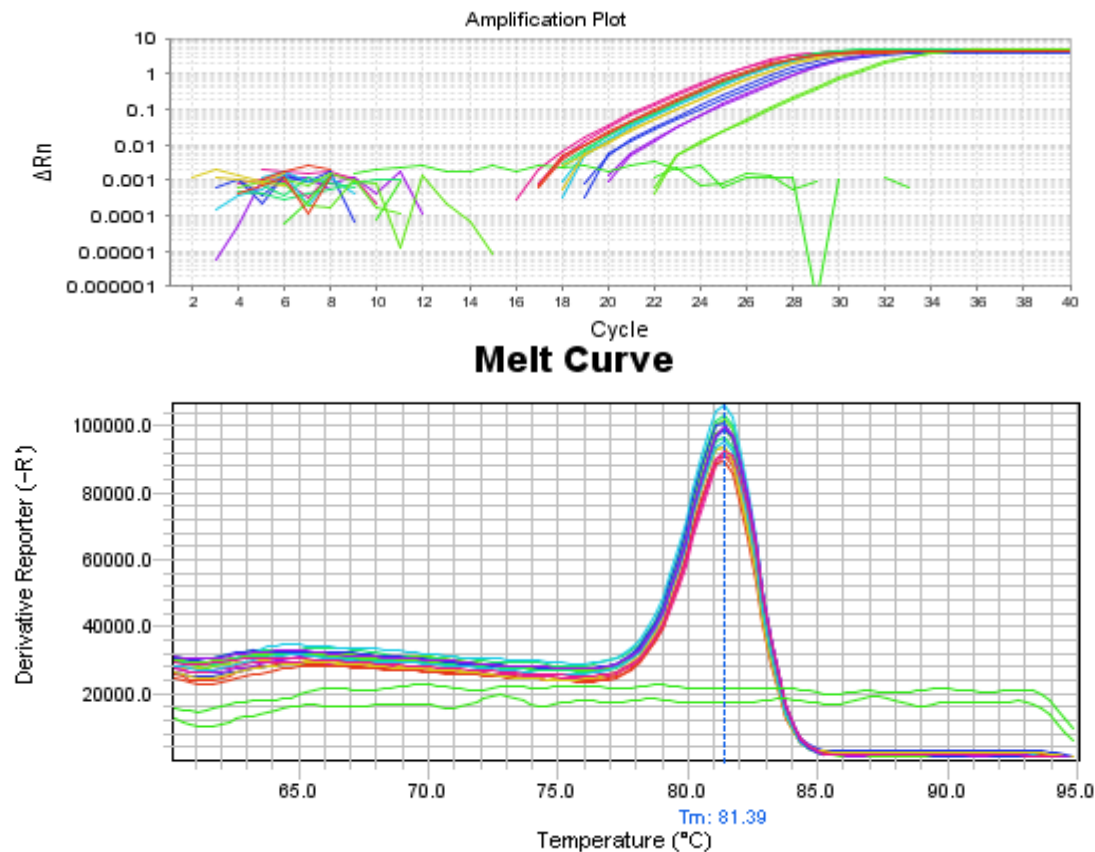
Amplificação e dissociação dos produtos de qRT-PCR de CD20 canino:



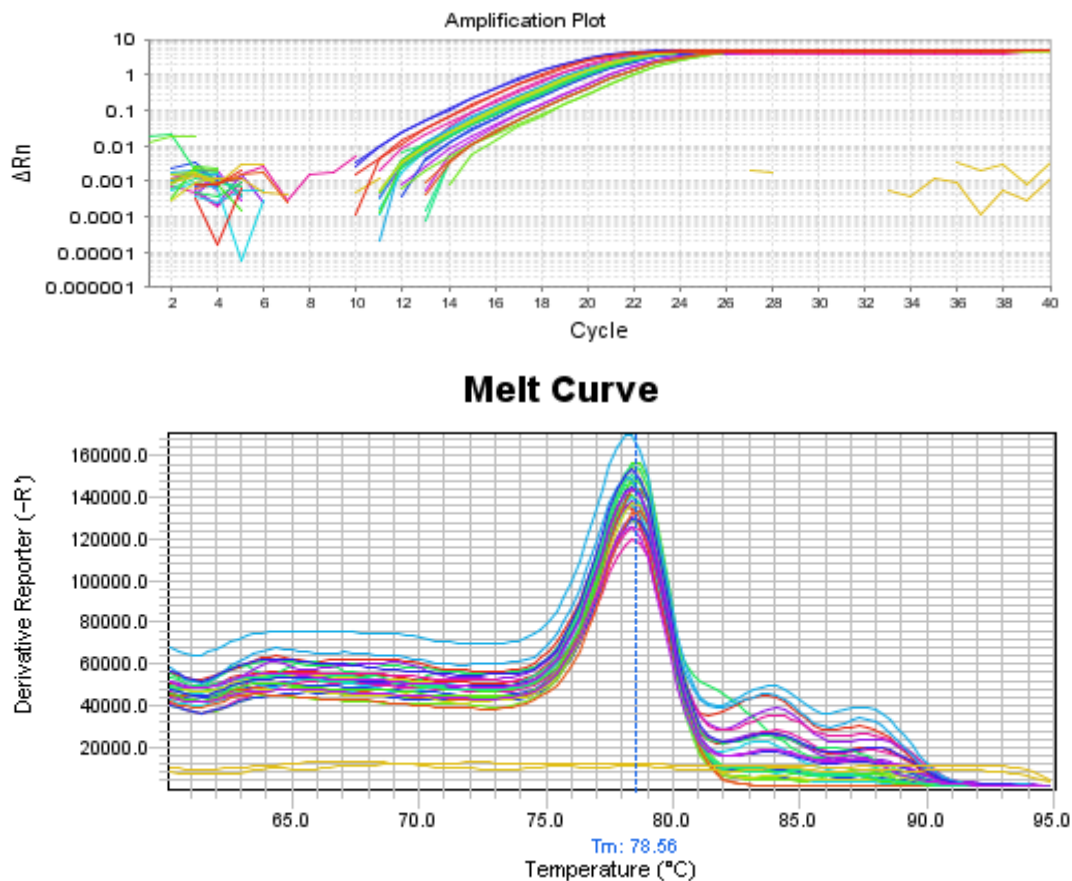
Amplificação e dissociação dos produtos de qRT-PCR de CD21 canino:



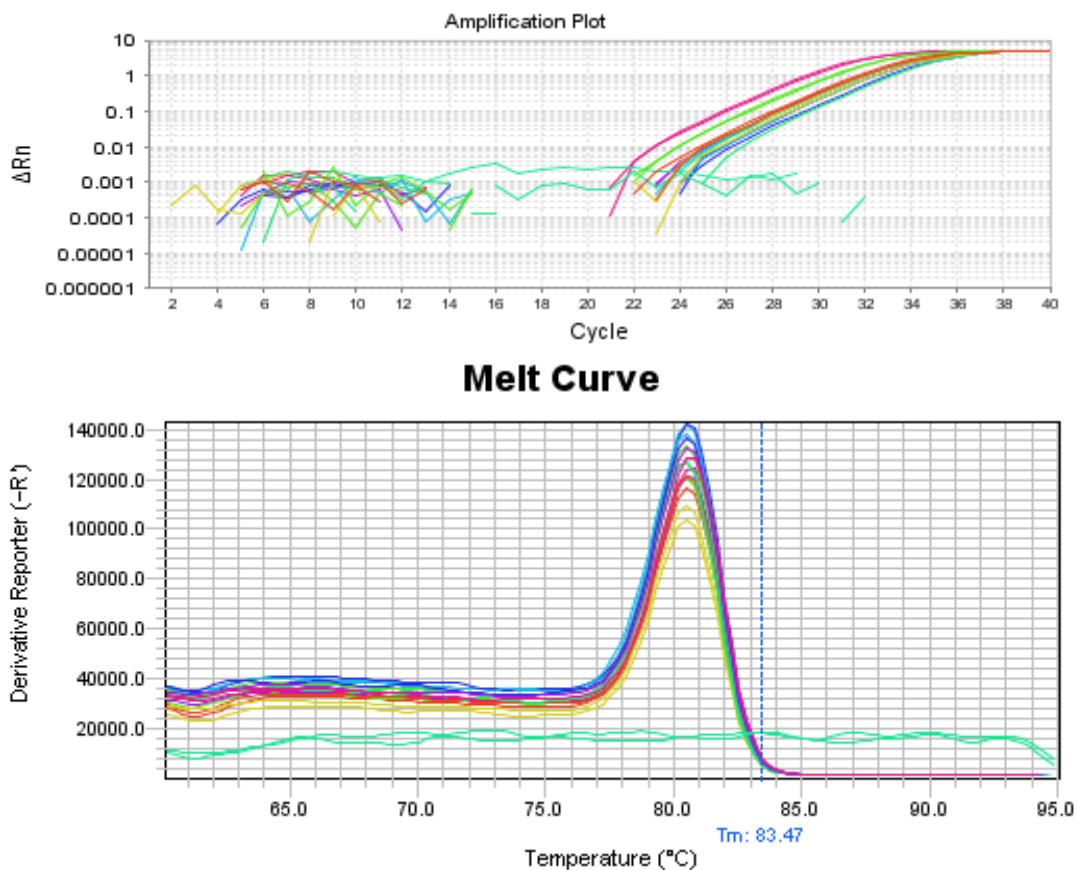
Amplificação e dissociação dos produtos de qRT-PCR de CD22 canino:



Amplificação e dissociação dos produtos de qRT-PCR de CD74 canino:

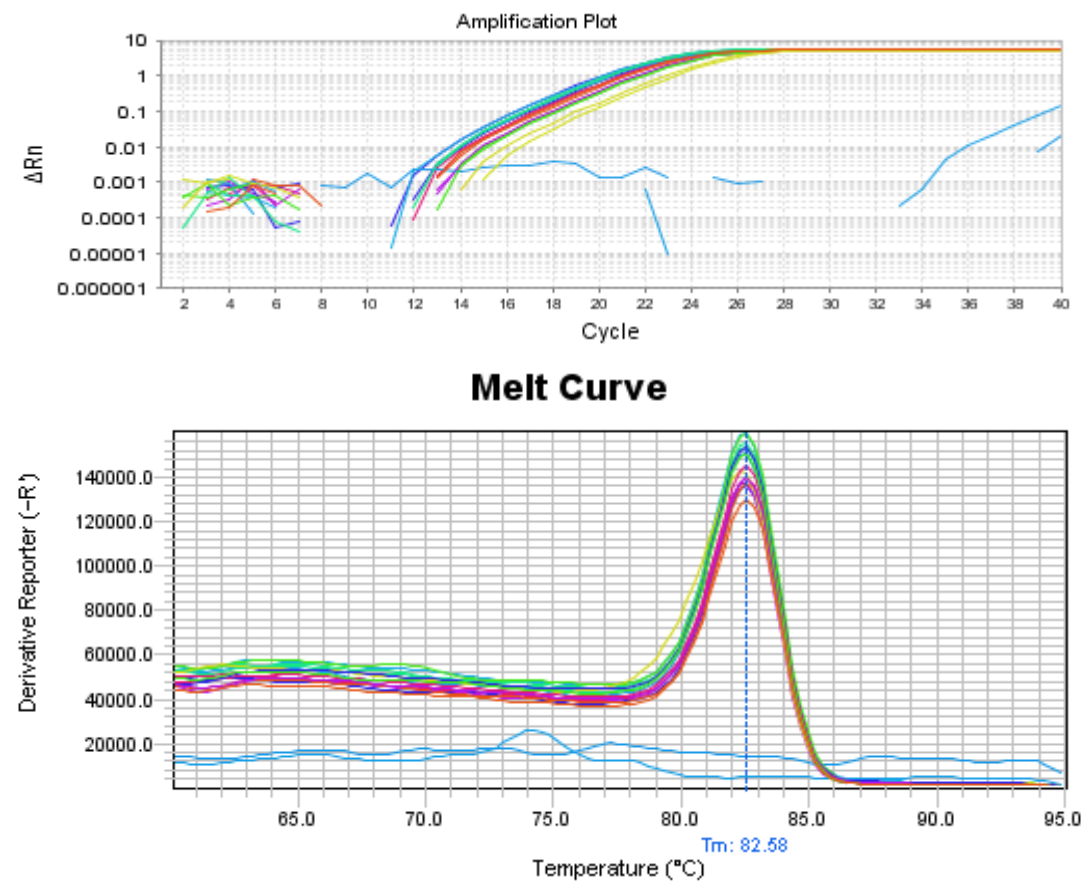


Amplificação e dissociação dos produtos de qRT-PCR de CD80 canino:





Amplificação e dissociação dos produtos de qRT-PCR de RPL27 canino:



#### Anexo IV: Tabelas complementares ao gráfico 5.

Quantificação da expressão dos recetores em linfoma B relativamente ao grupo controlo.

	Média	Erro-Padrão
CD19	10,85546	1,544441
CD20	8,216741	2,233951
CD21	0,052027	0,351713
CD22	4,981363	1,209473
CD74	0,497189	0,103601
CD80	0,788276	0,258561

Resultados de testes estatísticos para averiguar se as diferenças entre grupos encontradas são devidas ao acaso.

CD	Teste	<i>p</i>
CD19	<i>Two-sample Wilcoxon</i>	$1,23 \times 10^{-4}$
CD20	<i>Independent t-test</i>	0,0072
CD21	<i>Two-sample Wilcoxon</i>	$5,9 \times 10^{-4}$
CD22	<i>Two-sample Wilcoxon</i>	0,196
CD74	<i>Independent t-test</i>	$4,3 \times 10^{-4}$
CD80	<i>Independent t-test</i>	0,0064

**Anexo V: Tabelas de resultados dos testes de correlação de Spearman entre recetores.**

Resultados relativos a todos os animais ( $n=30$ ).

Correlação entre:	Teste de correlação de Spearman		Significado estatístico
	$p$	$Rho$	
CD19-CD20	$2,11 \times 10^{-7}$	0,906	Correlação muito forte
CD19-CD21	0,368	0,170	Não tem
CD19-CD22	0,534	-0,118	Não tem
CD19-CD74	0,829	0,041	Não tem
CD19-CD80	0,234	-0,224	Não tem
CD20-CD21	0,139	0,277	Não tem
CD20-CD22	0,377	-0,167	Não tem
CD20-CD74	0,266	0,209	Não tem
CD20-CD80	0,910	0,022	Não tem
CD21-CD22	0,067	-0,340	Não tem
CD21-CD74	0,009	0,475	Correlação
CD21-CD80	0,317	0,188	Não tem
CD22-CD74	0,090	-0,315	Não tem
CD22-CD80	0,307	0,192	Não tem
CD74-CD80	0,032	0,394	Correlação

Resultados relativos aos animais saudáveis do grupo controlo ( $n=8$ ).

Correlação entre:	Teste de correlação de Spearman		Significado estatístico
	$p$	$Rho$	
CD19-CD20	0,011	0,857	Correlação muito forte
CD19-CD21	0,005	0,905	Correlação muito forte
CD19-CD22	0,005	0,905	Correlação muito forte
CD19-CD74	0,977	0,024	Não tem
CD19-CD80	0,243	0,476	Não tem
CD20-CD21	$3,97 \times 10^{-4}$	0,976	Correlação muito forte
CD20-CD22	$3,97 \times 10^{-4}$	0,976	Correlação muito forte
CD20-CD74	0,665	0,190	Não tem
CD20-CD80	0,028	0,786	Correlação forte
CD21-CD22	0,001	0,952	Correlação muito forte
CD21-CD74	0,752	0,143	Não tem
CD21-CD80	0,037	0,762	Correlação forte
CD22-CD74	0,619	0,214	Não tem
CD22-CD80	0,058	0,714	Não tem
CD74-CD80	0,197	0,524	Não tem

Resultados relativos aos animais diagnosticados com linfoma de células B ( $n=18$ ).

Correlação entre:	Teste de correlação de Spearman		Significado estatístico
	$p$	$Rho$	
CD19-CD20	$3,33 \times 10^{-5}$	0,818	Correlação muito forte
CD19-CD21	0,015	0,570	Correlação
CD19-CD22	0,330	-0,243	Não tem
CD19-CD74	0,004	0,649	Correlação forte
CD19-CD80	0,229	0,298	Não tem
CD20-CD21	0,024	0,533	Correlação
CD20-CD22	0,152	-0,351	Não tem
CD20-CD74	$9,34 \times 10^{-5}$	0,800	Correlação muito forte
CD20-CD80	0,033	0,507	Correlação
CD21-CD22	0,441	-0,193	Não tem
CD21-CD74	0,203	0,315	Não tem
CD21-CD80	0,503	0,168	Não tem
CD22-CD74	0,421	-0,201	Não tem
CD22-CD80	0,525	0,160	Não tem
CD74-CD80	0,076	0,430	Não tem

